

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192228** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.02.15

(22) Дата подачи заявки  
2020.03.06

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C07K 14/72* (2006.01)  
*C12N 9/06* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ CD40L И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОЙ РЕГУЛЯЦИИ**

---

(31) 62/815,404; 62/835,554; 62/860,356

(32) 2019.03.08; 2019.04.18; 2019.06.12

(33) US

(86) PCT/US2020/021582

(87) WO 2020/185628 2020.09.17

(71) Заявитель:  
**ОБСИДИАН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
(US)

(72) Изобретатель:

**Шеьеста Майкл, Флери Майкл  
Луси, Элпек Кутлу Гоксу, Вайсман  
Элизабет Джейн, Сури Випин, Сан  
Дексю, Ли Дан Джун, Шаман Стивен  
Марк, Брискин Майкл Джозеф,  
Ричардсон Селесте, Кассум Тарик А.,  
Олс Мишель Линн, Долински Брайан,  
Иннисс Мара Кристин, Бридо Эмили,  
Гори Дженнифер Ли, Сетхи Дхрув  
Кам (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,  
Парамонова К.В. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложены настраиваемые биоконтурные системы, эффекторные модули и композиции для иммунотерапии рака. Также предложены способы индукции противораковых иммунных ответов у субъекта.

---

**202192228**

**A1**

**A1**

**202192228**

## КОМПОЗИЦИИ CD40L И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОЙ РЕГУЛЯЦИИ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество предварительной заявки США № 62/815404, поданной 08 марта 2019 г.; предварительной заявки США № 62/835554, поданной 18 апреля 2019 г.; и предварительной заявки США № 62/860356, поданной 12 июня 2019 г.; содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием 2095\_1216PCT\_ST25.txt, созданного 4 марта 2020 г., который имеет размер 10,8 МБ. Информация в электронном формате перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** Генная и клеточная виды терапии полностью изменяют медицину и предлагают новые возможности для лечения ранее неопределимых состояний. Однако большинство современных технологий не позволяют определять время появления или уровни индукции целевых белков. Это сделало многие потенциальные пути применения генной и клеточной терапии сложными или невозможными для безопасного и эффективного осуществления.

**[0004]** Недостаточный экзогенный и/или эндогенный контроль генов является критической проблемой при многих условиях генной и клеточной терапии. Это отсутствие настраиваемости также затрудняет безопасную экспрессию белков с узкими или неопределенными терапевтическими окнами или белков, требующих более дозированной или временной экспрессии.

**[0005]** Одним из подходов к регулируемой экспрессии или функции белков является применение доменов, чувствительных к лекарственным средствам (DRD), также известных как дестабилизирующие домены (DD). Домены, чувствительные к лекарственным средствам, представляют собой небольшие белковые домены, которые могут быть присоединены к целевому белку, представляющему интерес. DRD делают прикрепленный белок, представляющий интерес, нестабильным в отсутствие DRD-связывающего лиганда, и белок, представляющий интерес, быстро разрушается убиквитин-протеасомной системой клетки. Однако, когда специфический низкомолекулярный DRD-связывающий лиганд связывается с DRD, прикрепленный белок, представляющий интерес, стабилизируется и достигается функция белка.

**[0006]** Роль иммунной системы в контроле опухолей, в частности, цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, хорошо известна. Появляется все больше свидетельств того, что Т-клетки могут контролировать опухолевый рост и выживаемость у больных раком как на ранних, так и на поздних стадиях заболевания. Однако опухолеспецифические Т-клеточные ответы у больных

раком сложно повышать и поддерживать.

**[0007]** Т-клеточные пути, которым в настоящее время уделяется значительное внимание, включают передачу сигналов посредством цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4, CD152) и лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1, также известного как B7-Н1 или CD274). Однако в последнее время интерес к другим молекулам, которые передают сигналы посредством Т-клеточных путей, включая лиганд CD40 (CD40L), вызывают интерес в качестве медиаторов для контроля опухолей.

**[0008]** CD40L (также известный как CD154, лиганд CD40, gp39 или TBAM) представляет собой мембранный гликопротеин II типа с молекулярной массой 33 кДа (№ доступа в Swiss-Prot P29965). Кроме того, существуют более короткие растворимые формы CD40L с молекулярной массой 18 кДа (также известные как sCD40L или растворимые CD40L). Эти растворимые формы CD40L образуются в результате протеолитического процессинга мембраносвязанного белка, однако клеточная активность растворимых соединений является слабой в отсутствие олигомеризации более высокого порядка (например, тримеризации). CD40L связывает и активирует CD40.

**[0009]** CD40L представляет собой представителя семейства молекул TNF, который в первую очередь экспрессируется на активированных Т-клетках (включая подтипы Th0, Th1 и Th2) и образует гомотримеры, подобные другим представителям этого семейства. Кроме того, было обнаружено, что CD40L экспрессируется на тучных клетках и активированных базофилах и эозинофилах. CD40L связывается со своим рецептором CD40 на антигенпрезентирующих клетках (APC), что приводит ко многим эффектам в зависимости от типа целевой клетки. В общем, CD40L играет роль костимулирующей молекулы и индуцирует активацию APC в ассоциации со стимуляцией Т-клеточного рецептора молекулами МНС на APC. CD40L также может связываться с В-клетками, моноцитами, макрофагами, тромбоцитами, нейтрофилами, дендритными клетками, эндотелиальными клетками и  $\alpha$ SMC (гладкомышечными клетками). Связывание CD40L с CD40, экспрессируемым на дендритных клетках, может способствовать лицензированию дендритных клеток (DC). DC могут быть преобразованы в функциональное состояние антигенспецифической Т-клеткой-хелпером для активации цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, этот процесс называется лицензированием DC. Привлечение CD40 на DC приводит к стимуляции DC, о чем свидетельствует поверхностная экспрессия костимулирующих молекул и молекул МНС; продуцирование провоспалительных цитокинов (например, IL12 и TNF), а также распространение эпитопа, т.е. все иммунные ответы, которые, как считается, способствуют эрадикации опухоли и противоопухолевым эффектам.

**[0010]** Несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последнее десятилетие в разработке стратегий борьбы с раком и другими заболеваниями, пациенты с распространенным, рефрактерным и метастатическим заболеванием имеют ограниченные клинические возможности. Химиотерапия, облучение и высокодозная химиотерапия стали дозоограничивающими. Остается существенная

неудовлетворенная потребность в новых менее токсичных способах и терапевтических средствах, которые имеют лучшую терапевтическую эффективность, более длительный клинический эффект и улучшенные профили безопасности, в частности, для тех пациентов с распространенным заболеванием или видами раком, которые устойчивы к существующим терапевтическим средствам.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0011]** В настоящем описании предложены новые белковые домены, демонстрирующие стабильность, зависящую от малых молекул. Такие белковые домены называются доменами, чувствительными к лекарственным средствам (DRD). В отсутствие своего связывающего лиганда DRD дестабилизирует и вызывает расщепление полезной нагрузки или белка, представляющего интерес (POI) (используется в данном документе взаимозаменяемо), слитого с DRD, в то время как в присутствии своего связывающего лиганда функционально связанный DRD и полезная нагрузка могут быть стабилизированы, и его стабильность является дозозависимой.

**[0012]** В данном документе предложены композиции, которые содержат эффекторный модуль. Эффекторный модуль может включать в себя элемент ответа на стимул (SRE), который функционально связан с одной или несколькими полезными нагрузками. В различных вариантах осуществления SRE содержит домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD), или состоит по сути из домена, чувствительного к лекарственному средству (DRD), или состоит из домена, чувствительного к лекарственному средству (DRD). В данном контексте SRE также может обозначаться DRD или DD.

**[0013]** Композиции, которые приведены в данном документе в качестве примеров, включают, но не ограничиваясь ими, композицию, содержащую эффекторный модуль, при этом указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или мутант CD40L, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W или G227F, по отношению к SEQ ID NO: 3820, при этом указанная полезная нагрузка присоединена к указанному SRE, добавлена к нему или связана с ним. Композиции, проиллюстрированные выше, могут содержать DRD, при этом DRD включает полностью или частично белок ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR, при этом DRD дополнительно содержит одну или несколько мутаций в указанной аминокислотной последовательности белка ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR.

**[0014]** Иллюстративные полезные нагрузки CD40L, описанные в данном документе, могут содержать одну или несколько мутаций по отношению к SEQ ID NO: 3820, таких как, но не ограничиваясь ими, Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W или G227F. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820). В некоторых вариантах осуществления первая полезная нагрузка может представлять собой весь

CD40L (SEQ ID NO: 3820). Неограничивающие примеры полезных нагрузок, содержащих весь CD40L, могут представлять собой CD40L (H224G, G226F) (SEQ ID NO: 6598); CD40L (H224G, G226H) (SEQ ID NO: 6600); CD40L (Y172G, G226F) (SEQ ID NO: 6602); CD40L (Y170G, H224G, G226W) (SEQ ID NO: 6604); или CD40L (H125G, G227F) (SEQ ID NO: 6606).

**[0015]** SRE, описанный в данном документе, может реагировать или взаимодействовать по меньшей мере с одним стимулом. В одном варианте стимул может представлять собой малую молекулу.

**[0016]** В настоящем изобретении представлены композиции, которые содержат эффекторные модули с SRE, полученными из всего или части исходного белка, такого как есDHFR, и первую полезную нагрузку, которая содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820). В одном варианте осуществления SRE содержит аминокислоты 2-159 есDHFR. В некоторых вариантах осуществления SRE может содержать одну или несколько мутаций по сравнению с исходным белком. SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, SEQ ID NO: 6554, 6556, 6558, 6560, 6562, 6564, 6566, 6568, 6570, 6572, 6574, 6576, 6578, 6580, 6582, 6584, 6586, 6588 или 6590.

**[0017]** SRE, описанный в данном документе, может реагировать или взаимодействовать по меньшей мере с одним стимулом. В одном аспекте стимул может представлять собой малую молекулу, такую как, но не ограничиваясь ей, TMP.

**[0018]** В данном документе также предложены полинуклеотиды, кодирующие композиции, описанные в данном документе, а также векторы, кодирующие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие векторы, описанные в данном документе. В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, которые включают композиции, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель, а также модифицированные клетки или сконструированные клетки, экспрессирующие композиции, описанные в данном документе.

**[0019]** В данном документе также предложены способы лечения заболевания, например, субъекта, имеющего рак, который нуждается в таком лечении. Иллюстративный способ лечения рака в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения включает способ снижения опухолевой нагрузки у субъекта, включающий: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунных клеток, как раскрыто в данном документе, при этом иммунные клетки содержат эффекторный модуль, содержащий по меньшей мере один элемент ответа на стимул (SRE), при этом SRE функционально связан с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO. 3820) или мутант CD40L; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула для модуляции экспрессии первой полезной нагрузки, за счет чего уменьшается опухолевая нагрузка. В связанных вариантах осуществления эффекторный модуль может содержать вторую полезную нагрузку, которая экспрессируется в иммунных клетках в связи или без связи с тем же или другим DRD, что и первая полезная нагрузка. В некоторых связанных аспектах вторая полезная

нагрузка представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), например, CAR CD19, как описано в данном документе.

**[0020]** В иллюстративном примере в настоящем изобретении предложен способ активации дендритных клеток у субъекта, включающий стадии (a) введения субъекту одной или нескольких иммунных клеток, при этом одна или несколько иммунных клеток содержат эффекторный модуль, при этом эффекторный модуль имеет по меньшей мере один элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO. 3820) или его мутант; при этом иммунная клетка представляет собой Т-клетку; (b) введения субъекту терапевтически эффективного количества стимула, при этом стимул представляет собой лиганд, для модуляции экспрессии первой полезной нагрузки; и (c) измерения маркера активации дендритных клеток IL12 у субъекта в ответ на лиганд, для измерения активации дендритных клеток.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения представлены в прилагаемом описании ниже. Хотя любые материалы и способы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при испытании настоящего изобретения, в данном документе описаны предпочтительные материалы и способы. Другие особенности, объекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания. В описании формы единственного числа также включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. В случае конфликта настоящее описание будет приоритетным.

### A. КОМПОЗИЦИИ

**[0021]** Настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам, молекулам нуклеиновых кислот, векторам и клеточным и генным видам терапии, в которых время появления или уровни нативного терапевтического белка можно регулировать путем введения перорального низкомолекулярного лекарственного средства. Кроме того, в настоящем изобретении предложены композиции, системы и способы для настраиваемой экспрессии белка, представляющего интерес (POI, также обозначаемого в данном документе «полезной нагрузкой»), что может использоваться взаимозаменяемо). Композиции относятся к системам настраиваемой экспрессии белка, представляющего интерес, в клетке и агентам, которые индуцируют трансляцию полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD), функционально связанный по меньшей мере с одним белком, представляющим интерес. Композиции, представленные в настоящем изобретении, содержат молекулы нуклеиновых кислот,

полипептиды и модифицированные клетки, относящиеся к системам настраиваемой экспрессии белка, представляющего интерес, для применения при лечении заболевания в присутствии лиганда, который стабилизирует DRD. Способы, относящиеся к настраиваемым системам для экспрессии белка, которые предложены в настоящем изобретении, включают способы получения модифицированных клеток и способы лечения или предупреждения заболевания.

**[0022]** В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает: а. получение популяции клеток; б. введение по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одну клетку в популяции клеток, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представляющий интерес, функционально связанный с доменом, чувствительным к лекарственному средству (DRD); с. доставку клетки в организм субъекта; и d. введение субъекту лиганда, который стабилизирует DRD в достаточной степени, чтобы обеспечить экспрессию белка, представляющего интерес, по меньшей мере в одной клетке; при этом экспрессия белка, представляющего интерес, регулируется присутствием лиганда у субъекта, а количество и/или продолжительность введения лиганда достаточны для получения терапевтически эффективного количества белка, представляющего интерес, по меньшей мере в одной клетке в популяции клеток.

1. Настраиваемые системы экспрессии белка

**[0023]** В целом, элемент ответа на стимул (SRE), содержащий DRD, может быть функционально связан с конструкцией полезной нагрузки, которая может представлять собой любую полезную нагрузку (например, иммунотерапевтический агент), с образованием эффекторного модуля. SRE при активации определенным стимулом, стабилизирующим лигандом или просто лигандом (используется в данном документе взаимозаменяемо), например, малой молекулой, может приводить к образованию сигнала или результата для регулирования уровней транскрипции, трансляции и/или белка связанной полезной нагрузки в сконструированной клетке. Настраиваемая экспрессия полезной нагрузки может модулироваться либо при повышении, либо снижении путем предоставления или исключения стабилизирующего лиганда, который стабилизирует DRD для осуществления настраиваемой экспрессии функционально связанной полезной нагрузки. В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, которые кодируют SRE, которые настраивают уровни экспрессии и активности любых агентов, применяемых для иммунотерапии.

**[0024]** В контексте данного документа «биокионтур» или «биокионтурная система» определяется как контур внутри биологических систем или применимый в них, содержащий стимул и по меньшей мере один эффекторный модуль, отвечающий на стимул, при этом ответ на стимул приводит к образованию по меньшей мере одного сигнала или результата внутри биологической системы, между ней, в качестве индикатора, или на ней. Под биологическими системами обычно понимают

любую клетку, ткань, орган, систему органов или организм животного, растения, гриба, бактерии или вируса. Также понятно, что биоконтуры могут представлять собой искусственные контуры, которые используют стимулы или эффекторные модули, описанные в настоящем изобретении, и воздействуют на сигналы или результаты в бесклеточных средах, таких как диагностические, репортерные системы, устройства, анализы или наборы. Искусственные контуры могут быть ассоциированы с одним или несколькими электронными, магнитными или радиоактивными компонентами или частями.

## 2. Эффекторные модули и элементы ответа на стимул (SRE)

**[0025]** Системы, композиции и способы по настоящему изобретению включают по меньшей мере один элемент ответа на стимул в качестве компонента системы эффекторного модуля. В контексте данного документа «эффекторный модуль» представляет собой одно- или многокомпонентную конструкцию или комплекс, содержащий по меньшей мере (a) один или несколько элементов ответа на стимул и (b) одну или несколько полезных нагрузок (например, полезных нагрузок, представляющих интерес, или белков, представляющих интерес (POI)). В одном варианте осуществления DRD SRE содержит полностью или частично белок ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR, при этом DRD дополнительно содержит одну или несколько мутаций в указанной аминокислотной последовательности белок ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR. В одном варианте осуществления полезная нагрузка содержит CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или мутант CD40L, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W или G227F, по отношению к SEQ ID NO: 3820.

**[0026]** В контексте данного документа «элемент ответа на стимул (SRE)» представляет собой компонент эффекторного модуля, который связан с одной или несколькими полезными нагрузками эффекторного модуля, присоединен к ним, функционально связан с ними или ассоциирован с ними, и в некоторых случаях отвечает за природу ответа эффекторного модуля на один или несколько стимулов. В контексте данного документа термин природа «ответа» SRE на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или косвенной ассоциацией или структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, реакция любого SRE на стимул может зависеть от степени или вида. Ответ может быть частичным. Ответ может быть обратимым. Ответ в конечном итоге может приводить к регулируемому сигналу или результату. Такой выходной сигнал может иметь относительную природу по отношению к стимулу, например, приводить к модулирующему эффекту от 1% до 100% или факторному увеличению или уменьшению, такому как в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз или более раз.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модуляции экспрессии, функции или уровня белка. В некоторых аспектах модуляция экспрессии, функции или уровня белка относится к модуляции экспрессии, функции или уровня на по меньшей мере приблизительно 20%, например, на по меньшей мере приблизительно 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 100% или на по меньшей мере 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-95%, 20-100%, 30-40%, 30-50%, 30-60%, 30-70%, 30-80%, 30-90%, 30-95%, 30-100%, 40-50%, 40-60%, 40-70%, 40-80%, 40-90%, 40-95%, 40-100%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-95%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-95%, 70-100%, 80-90%, 80-95%, 80-100%, 90-95%, 90-100% или 95-100%.

### 3. Характеристика лиганд-зависимой активности настраиваемой системы экспрессии белка

**[0028]** Лиганд-зависимая активность настраиваемой системы экспрессии белка может быть охарактеризована с помощью различных способов.

**[0029]** В некоторых вариантах осуществления лиганд-зависимая активность настраиваемой системы экспрессии белка характеризуется лиганд-зависимой регуляцией DRD. В некоторых вариантах осуществления лиганд-зависимая активность настраиваемой системы экспрессии белка характеризуется дозозависимой регуляцией DRD. Лиганд-зависимая регуляция полипептида фактора транскрипции DRD может быть охарактеризована с помощью различных способов. В некоторых аспектах лиганд-зависимая регуляция DRD может быть оценена путем измерения уровней DRD, функционально связанного белка, представляющего интерес, или обоих, например, с помощью иммуноанализа, нацеленного на измерение уровней DRD, белка, представляющего интерес, или обоих.

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления лиганд-зависимая активность настраиваемой системы экспрессии белка характеризуется лиганд-зависимой экспрессией полезной нагрузки, функционально связанной с DRD. Экспрессию полезной нагрузки можно оценить с помощью различных способов. В некоторых аспектах экспрессию полезной нагрузки оценивают путем измерения уровней белка/полипептида.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемую систему экспрессии белка можно сравнить с настраиваемой системой экспрессии белка, в которой отсутствует DRD. В некоторых вариантах осуществления лиганд-зависимая активность настраиваемой системы экспрессии белка может быть проанализирована или охарактеризована по отношению к активности настраиваемой системы экспрессии белка, содержащей конструкцию, содержащую полезную нагрузку, в которой отсутствует DRD.

**[0032]** В различных вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка обеспечивает настраиваемую экспрессию белка, представляющего интерес, или полезной нагрузки (используется в данном документе взаимозаменяемо). В различных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, представляющий интерес, и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует DRD. Нуклеотидная последовательность, кодирующая DRD, может быть расположена выше или ниже последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полезную нагрузку.

**[0033]** Когда клетка или организм, содержащие DRD, подвергаются воздействию экзогенного стабилизирующего лиганда, DRD стабилизируется. Стабилизированный DRD и любые полипептидные последовательности, расположенные выше или ниже DRD, также стабилизируются и не транспортируются в направлении пути разложения убиквитиновых протеасом. В отсутствие экзогенного стабилизирующего лиганда DRD и любые функционально связанные полипептидные последовательности, функционально связанные с DRD выше и/или ниже DRD, расщепляются и элиминируются в клетке. Таким образом, как количество, так и время экспрессии белка можно контролировать путем введения экзогенного стабилизирующего лиганда в клетку или организм.

**[0034]** В различных вариантах осуществления DRD и белок, представляющий интерес, обычно функционально связаны или могут быть разделены одной или несколькими промежуточными последовательностями нуклеотидов, пептидов, полипептидов или белков, например, линкером, сигнальной последовательностью, лидерной последовательностью, трансмембранным доменом, внутривхостовым доменом сайта расщепления. В различных вариантах осуществления первый полинуклеотид может содержать первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD), и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представляющий интерес. В таких вариантах осуществления белок, представляющий интерес, описанный в данном документе в клетке, функционально связан с DRD. Кроме того, клетка может также содержать другие необязательные нуклеотидные, пептидные, полипептидные или белковые последовательности, которые могут быть функционально связаны с DRD, белком, представляющим интерес, или обоими.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотиды, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит по меньшей мере первый полинуклеотид, который может содержать первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полезную нагрузку; вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD), который функционально связан с полезной нагрузкой. Необязательно в некоторых вариантах осуществления первый полинуклеотид и/или вектор могут содержать дополнительные компоненты настраиваемой системы экспрессии белка, например, для моноцистронной и/или бицистронной экспрессии одной или нескольких полезных нагрузок и одного или нескольких DRD, например, последовательности IRES и сайты расщепления с необязательными промежуточными пептидными или полипептидными последовательностями, расположенными выше или ниже полезной нагрузки; или выше или ниже от DRD.

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления векторы также имеют точку начала репликации (*ori*), которая позволяет амплифицировать вектор, например, в бактериях. В качестве дополнения или в качестве альтернативы вектор содержит селективируемые маркеры, такие как гены устойчивости к антибиотикам, гены окрашенных маркеров и гены «самоубийства», и другие

регуляторные последовательности, которые обеспечивают клонирование и/или экспрессию в бактериях, вирусах и в эукариотических клетках.

#### 4. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD)

**[0037]** Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD или DD), представляют собой белковые домены, которые нестабильны и расщепляются в отсутствие лиганда, однако стабильность которых восстанавливается путем связывания с соответствующим DRD-связывающим лигандом, также обозначаемым в данном документе стимулом, или стимулирующим лигандом или просто лигандом. Термин «домен, чувствительный к лекарственным средствам» (DRD), используется взаимозаменяемо с термином «дестабилизирующий домен» (DD). Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), могут быть присоединены к полипептиду или белку, представляющим интерес, и могут сделать присоединенный полипептид или белок нестабильным в отсутствие DRD-связывающего лиганда. DRD передают свое дестабилизирующее свойство присоединенному полипептиду или белку посредством расщепления белка. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что в отсутствие DRD-связывающего лиганда присоединенный или функционально связанный полипептид или белок быстро расщепляется убиквитин-протеасомной системой клетки. Лиганд, который связывается с DRD или взаимодействует с ним, может при таком связывании или взаимодействии модулировать стабильность DRD и любого присоединенного или функционально связанного полипептида или белка. Когда лиганд связывает предполагаемый DRD, нестабильность обращается, и функция присоединенного полипептида или белка может быть восстановлена. Условная природа стабильности DRD позволяет быстро и без отклонений переключаться со стабильного белка на нестабильный субстрат для расщепления. Более того, его зависимость от концентрации его лиганда дополнительно обеспечивает настраиваемый контроль скорости разложения.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению могут быть получены из известных полипептидов, которые способны к посттрансляционной регуляции белков. В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению могут быть разработаны или получены из известных белков. Области, части или домены белков дикого типа могут быть использованы в качестве DRD полностью или частично. Они могут быть объединены или реаранжированы для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любые из которых могут быть использованы в качестве DRD или отправной точки для конструирования дополнительных DRD.

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления DRD может быть получен из исходного белка или из мутантного белка, имеющего одну, две, три или более аминокислотных мутаций по сравнению с исходным белком. В некоторых вариантах осуществления исходный белок может быть выбран из, но не ограничиваясь ими, FKBP; белка FKBP человека; DHFR человека (hDHFR); DHFR E. coli (ecDHFR); PDE5 (фосфодиэстераза 5); и ER (эстрогенового рецептора). Примеры белков, которые

можно использовать для разработки DRD, и их лигандов приведены в Табл. 1.

**[0040]** Таблица 1: DRD и их связывающие лиганды

Идентификатор DRD	Белок	SEQ ID NO белка:	SEQ ID NO нуклеиновой кислоты:	Лиганды
PDE5DD-187	Фосфодиэстераза 5 человека (hPDE5) (ID в Uniprot: O76074)	1	2	Силденафил; варденафил; тадалафил
PDE5DD-229	Фосфодиэстераза 5 человека (hPDE5), изоформа 2	23	24	
PDE5DD-232	Фосфодиэстераза 5 человека (hPDE5), изоформа 3	25	26-27	
PDE5DD-234	Фосфодиэстераза 5 человека (hPDE5), изоформа X1	28	29	
hDHFRDD-84	Дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR), изоформа 1 (ID в Uniprot: P00374.2)	30	31	Метотрексат (MTX), триметоприм (TMP)
hDHFRDD-87	Вариант дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR) (hDHFR)	32		Метотрексат (MTX), триметоприм (TMP)
hDHFRDD-88	Дигидрофолатредуктаза 2 (hDHFR2) (DHFR1)	33	34	Метотрексат (MTX), триметоприм (TMP)
ecDHFRDD-6	Дигидрофолатредуктаза E. coli (ecDHFR) (ID в Uniprot: P0ABQ4)	35	36	Метотрексат (MTX), триметоприм (TMP)
FKBPDD-8	FK506-связывающий белок (FKBP) (Uniprot ID: P62942)	37		Shield-1

ERDD-4	Эстрогеновый рецептор (ER) (ID в Uniprot: P03372.2)	42	Базедоксифен, ралоксифен, 4-гидрокситамоксифен (4-ОНТ), фулвестрант, оремифен, лазофоксифен, кломифен, фемарелле, ормелоксифен
--------	---	----	--

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления последовательность белка, используемого для разработки DRD, может содержать всю, часть или область белковой последовательности, указанной в Табл. 1. В некоторых вариантах осуществления белки, которые можно использовать для разработки DRD, включают изоформы белков, приведенных в Табл. 1.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из hPDE5. В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из изоформы 2 hPDE5. В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из изоформы 3 hPDE5. В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из изоформы X1 hPDE5.

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из белка дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR), такого как, но не ограничиваясь ими, дигидрофолатредуктаза 1 человека (hDHFR1), дигидрофолатредуктаза 2 человека (hDHFR2) или их фрагмент или вариант.

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из дигидрофолатредуктазы *E. coli* (ecDHFR). В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0046]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из белка FK506-связывающего белка (FKBP) или его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из эстрогенового рецептора (ER) или его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0048]** Аминокислотные последовательности DRD, охватываемые настоящим изобретением, идентичны на по меньшей мере приблизительно 70%, предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 75% или 80%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, и еще более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности исходного белка, из которого она получена.

**[0049]** Примеры DRD по настоящему изобретению включают полученные из: DHFR человека, есDHFR, эстрогенового рецептора человека (ER), FKBP, белка FKBP человека и PDE5 человека. Подходящие DRD, которые можно обозначать как домены, чувствительные к лекарственным средствам, или лиганд-связывающие домены, также известны из уровня техники. См., например, WO2018/161000; WO2018/231759; WO2019/241315; US8,173,792; US8,530,636; WO2018/237323; WO2017/181119; US2017/0114346; US2019/0300864; WO2017/156238; Miyazaki et al., J Am Chem Soc, 134:3942 (2012); Banaszynski et al. (2006) Cell 126:995–1004; Stankunas, K. et al. (2003) Mol. Cell 12:1615–1624; Banaszynski et al. (2008) Nat. Med. 14:1123-1127; Iwamoto et al. (2010) Chem. Biol. 17:981-988; Armstrong et al. (2007) Nat. Methods 4:1007-1009; Madeira da Silva et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:7583-7588; Pruett-Miller et al. (2009) PLoS Genet. 5:e1000376; и Feng et al. (2015) Elife 4:e10606.

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из белка дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR), такого как, но не ограничиваясь ими, дигидрофолатредуктаза 1 человека (hDHFR1), дигидрофолатредуктаза 2 человека (hDHFR2) или их фрагмент или вариант.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно

получать из белка hDHFR и он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из дигидрофолатредуктазы *E. coli* (ecDHFR). В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ecDHFR и он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0053]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из белка FK506-связывающего белка (FKBP) или его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка FKBP он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0054]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению получают из эстрогенового рецептора (ER) или его фрагмента или варианта. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER он может содержать более одной мутации. В некоторых вариантах осуществления DRD можно получать из белка ER он может содержать две, три, четыре или пять мутаций.

**[0055]** Аминокислотные последовательности DRD, охватываемые настоящим изобретением, идентичны на по меньшей мере приблизительно 70%, предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 75% или 80%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, и еще более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности исходного белка, из которого она получена.

**[0056]** Примеры DRD по настоящему изобретению включают полученные из: DHFR человека, ecDHFR, эстрогенового рецептора человека (ER), FKBP, белка FKBP человека и PDE5 человека. Подходящие DRD, которые можно обозначать как домены, чувствительные к лекарственным средствам, или лиганд-связывающие домены, также известны из уровня техники. См., например, WO2018/161000; WO2018/231759; WO2019/241315; US8,173,792; US8,530,636; WO2018/237323; WO2017/181119; US2017/0114346; US2019/0300864; WO2017/156238; Miyazaki et al., *J Am Chem Soc*, 134:3942 (2012); Banaszynski et al. (2006) *Cell* 126:995–1004; Stankunas, K. et al. (2003) *Mol. Cell* 12:1615–1624; Banaszynski et al. (2008) *Nat. Med.* 14:1123-1127; Iwamoto et al. (2010) *Chem. Biol.* 17:981-988; Armstrong et al. (2007) *Nat. Methods* 4:1007-1009; Madeira da Silva et al. (2009) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 106:7583-7588; Pruett-Miller et al. (2009) PLoS Genet. 5:e1000376; и Feng et al. (2015) Elife 4:e10606.

**[0057]** В одном варианте осуществления SRE получают из области исходного белка или из мутантного белка. Длина области исходного белка может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[0058]** В одном варианте осуществления SRE получают из исходного белка или из мутантного белка и он содержит область исходного белка. SRE может содержать область исходного белка, которая составляет 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-

50%, 50-75% или 75-100% исходного белка или мутантного белка.

**[0059]** В одном варианте осуществления SRE получают из исходного белка или из мутантного белка и он может быть на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% идентичным исходному белку или мутантному белку.

**[0060]** В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD). Эффекторные модули и/или SRE могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 DRD. При наличии более одного DRD, каждый из DRD может быть получен из одного и того же исходного белка (например, PDE5), из разных исходных белков (например, PDE5 и hDHFR), может представлять собой слияние двух разных исходных белков или может быть искусственным.

**[0061]** В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 2 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 3 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 4 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 5 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 6 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 7 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 8 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 9 DRD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут содержать 10 DRD. DRD могут быть получены из любого исходного белка, известного из уровня техники и/или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DRD получают из одного и того же исходного белка (например, PDE5). В некоторых вариантах осуществления DRD получают из разных областей одного и того же исходного белка (например, аминокислоты 535-860 и аминокислоты 590-836 PDE5). В некоторых вариантах осуществления DRD получают из разных исходных белков (например, PDE5 и hDHFR).

5. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR)

**[0062]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен,

чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из белка дигидрофолатредуктазы (hDHFR) человека, такого как, но не ограничиваясь ими, дигидрофолатредуктазы 1 человека (hDHFR1), дигидрофолатредуктазы 2 человека (hDHFR2) или их фрагмента или варианта. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DRD, полученный из hDHFR1. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DRD, полученный из hDHFR2.

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления DRD по настоящему изобретению могут быть получены из дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR). hDHFR представляет собой небольшой (18 кДа) фермент, который катализирует восстановление дигидрофолата и играет жизненно важную роль в различных анаболических путях. Дигидрофолатредуктаза (DHFR) является важным ферментом, который превращает 7,8-дигидрофолат (DHF) в 5,6,7,8-тетрагидрофолат (THF) в присутствии никотинамидадениндигидрофосфата (NADPH). Антифолатные средства, такие как метотрексат (MTX), структурный аналог фолиевой кислоты, который связывается с DHFR сильнее, чем естественный субстрат DHF, нарушает метаболизм фолиевой кислоты, в основном за счет ингибирования дигидрофолатредуктазы, что приводит к подавлению синтеза предшественников пурина и пиримидина. Другие ингибиторы hDHFR, такие как фолат, TQD, триметоприм (TMP), эпигаллокатехингаллат (EGCG) и ECG (эпикатехингаллат), также могут связываться с hDHFR и регулировать ее стабильность.

**[0064]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка hDHFR. Длина области белка hDHFR может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382,

383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[0065]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. Неограничивающие примеры мутаций включают M1del, V2A, C7R, I8V, V9A, A10T, A10V, Q13R, N14S, G16S, I17N, I17V, K19E, N20D, G21E, G21T, D22S, L23S, P24S, L28P, N30D, N30H, N30S, E31D, E31G, F32M, R33G, R33S, F35L, Q36F, Q36K, Q36R, Q36S, R37G, M38T, M38V, T40A, V44A, K47R, N49D, N49S, M53T, G54R, K56E, K56R, T57A, F59S, I61T, E63G, K64R, N65A, N65D, N65F, N65S, L68S, K69E, K69R, R71G, I72A, I72T, I72V, N73G, L74N, V75F, R78G, L80P, K81R, E82G, H88Y, F89L, R92G, S93G, S93R, L94A, D96G, A97T, L98S, K99G, K99R, L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, M112T, M112V, V113A, W114R, I115L, I115V, V116I, G117D, V121A, Y122C, Y122D, Y122I, Y122N, A107T, A107V, N108D, K109E, K109R, V110A, D111N, K123E, K123R, A125F, M126I, N127R, N127S, N127Y, H128R, H128Y, H131R, L132P, K133E, L134P, F135L, F135P, F135S, F135V, V136M, T137R, R138G, R138I, I139T, I139V, M140I, M140V, Q141R, D142G, F143L, F143S, E144G, D146G, T147A, F148L, F148S, F149L, P150L, E151G, I152V, D153A, D153G, E155G, K156R, Y157C, Y157R, K158E, K158R, L159P, L160P, E162G, Y163C, V166A, N168D, S168C, D169G, V170A, Q171R, E172G, E173A, E173G, K174R, I176A, I176F, I176T, K177E, K177R, Y178C, Y178H, F180L, E181G, V182A, Y183C, Y183H, E184G, E184R, K185del, K185E, K185R, N186D, N186S, D187G и D187N.

**[0066]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка hDHFR и он может содержать более одной мутации. Любая из мутаций, перечисленных в данном документе, может быть включена в DRD. Неограничивающие примеры двойных мутаций включают C7R, Y163C; A10V, H88Y; I17V, Y122I; G21T, Y122I; Q36K, Y122I; M53T, R138I; T57A, I72A; E63G, I176F; L74N, Y122I; V75F, Y122I; L94A, T147A; V121A, Y122I; Y122I, A125F; Y122I, N127Y; Y122I, M140I; H131R, E144G; T137R, F143L; E162G, I176F; Y178H, E181G; Y183H, K185E; M1del, I17V; M1del, Y122I; M1del, K185E; M1del, N127Y; M1del, N168D; и M1del, M140I. Неограничивающие примеры тройных мутаций включают I8V, K133E, Y163C; V9A, S93R, P150L; K19E, F89L, E181G; G21E, I72V, I176T; L23S, V121A, Y157C; E31D, F32M, V116I; Q36F, N65F, Y122I; Q36K, N65F, Y122I; Q36F, Y122I, A125F; N49D, F59S, D153G; V110A, V136M, K177R; Y122I, H131R, E144G; M1del, I17V, Y122I; M1del, G21T, Y122I; M1del, G21T, Y122N; M1del, Q36K, Y122I; M1del, M53T, R138I; M1del, L74N, Y122I; M1del, V75F, Y122I; M1del, L94A, T147A; M1del, V121A, Y122I; M1del, Y122I, A125F; M1del, Y122I, M140I; M1del, Y122I, N127Y; M1del, H131R, E144G; и M1del, E162G, I176F. Неограничивающие примеры четырех мутаций включают G54R, I115L, M140V, S168C; M1del,

E31D, F32M, V116I; M1del, Q36F, N65F, Y122I; M1del, Q36F, Y122I, A125F; M1del, Q36K, N65F, Y122I; и M1del, Y122I, H131R, E144G. Неограничивающие примеры пяти мутаций включают V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R; D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S; и M1del, D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S. Неограничивающие примеры более пяти мутаций включают I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G; G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R; K81R, K99R, L100P, E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E; R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S; N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L; F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G; L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R; V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S; L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S; и A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R, I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D, M112V, W114R, Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N.

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из hDHFR, могут содержать аминокислоты 2-187 исходной последовательности hDHFR. В данном документе это называется мутацией M1del.

**[0068]** В одном варианте осуществления стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с SRE для посттрансляционной регуляции уровней белка. В одном аспекте лиганды DHFR триметоприм (TMP) и метотрексат (MTX) используются для стабилизации мутантов hDHFR.

**[0069]** Неограничивающий перечень доменов, чувствительных к лекарственным средствам, полученных из hDHFR (аминокислотных последовательностей и последовательностей нуклеиновых кислот), приведен в Табл. 2. Положение мутированной аминокислоты, указанной в Табл. 2, указано по отношению к DHFR человека (ID в Uniprot: P00374) SEQ ID NO: 30 для DRD, полученных из hDHFR (обозначается в Табл. 2 как «ДТ»). В Табл. 2 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в этом положении по отношению к последовательности дикого типа. В Табл. 2 домен, чувствительный к лекарственным средствам, полученный из DHFR, содержащий аминокислоты 1-187 исходной последовательности hDHFR, обозначен как hDHFR с идентичностью мутаций в скобках, например, hDHFR (Y122I).

**[0070]** Таблица 2: Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DD), полученные из hDHFR

Идентификатор	Области и мутации hDHFR	SEQ	ID	SEQ	ID
---------------	-------------------------	-----	----	-----	----

DRD		аминокислоты	нуклеиновой кислоты
hDHFRRDD-1	hDHFR (Y122I)	78	79
hDHFRRDD-2	hDHFR (K81R)	80	81
hDHFRRDD-3	hDHFR (F59S)	82	83
hDHFRRDD-4	hDHFR (I17V)	84	85
hDHFRRDD-5	hDHFR (N65D)	86	87
hDHFRRDD-6	hDHFR (A107V)	88	89
hDHFRRDD-7	hDHFR (N127Y)	90	91
hDHFRRDD-8	hDHFR (M140I)	92	93
hDHFRRDD-9	hDHFR (K185E)	94	95
hDHFRRDD-10	hDHFR (N186D)	96	97
hDHFRRDD-11	hDHFR (2-187 ДТ)	98	99
hDHFRRDD-12	hDHFR (2-187 ДТ, N168D)	100	101
hDHFRRDD-13	hDHFR (2-187 ДТ, M140I)	102	103
hDHFRRDD-14	hDHFR (C7R, Y163C)	104	105
hDHFRRDD-15	hDHFR (A10V, H88Y)	106	107
hDHFRRDD-16	hDHFR (I17V, Y122I)	108	109
hDHFRRDD-17	hDHFR (G21T, Y122I)	110	111
hDHFRRDD-18	hDHFR (Q36K, Y122I)	112	113
hDHFRRDD-19	hDHFR (M53T, R138I)	114	115
hDHFRRDD-20	hDHFR (T57A, I72A)	116	117
hDHFRRDD-21	hDHFR (E63G, I176F)	118	-
hDHFRRDD-22	hDHFR (L74N, Y122I)	119	120
hDHFRRDD-23	hDHFR(V75F, Y122I)	121	122
hDHFRRDD-24	hDHFR(L94A, T147A)	123	124
hDHFRRDD-25	hDHFR(V121A, Y122I)	125	126
hDHFRRDD-26	hDHFR(Y122I, A125F)	127	128
hDHFRRDD-27	hDHFR(Y122I, N127Y)	129	130
hDHFRRDD-28	hDHFR(Y122I, M140I)	131	132
hDHFRRDD-29	hDHFR(H131R, E144G)	133	134
hDHFRRDD-30	hDHFR(T137R, F143L)	135	136
hDHFRRDD-31	hDHFR(E162G, I176F)	137	138
hDHFRRDD-32	hDHFR(Y178H, E181G)	139	140

hDHFRRDD-33	hDHFR(Y183H, K185E)	141	142
hDHFRRDD-34	hDHFR(2-187 ДТ, I17V)	143	144
hDHFRRDD-35	hDHFR(2-187 ДТ, Y122I)	145	146-148
hDHFRRDD-36	hDHFR(2-187 ДТ, K185E)	149	150
hDHFRRDD-37	hDHFR(2-187 ДТ, N127Y)	151	152
hDHFRRDD-38	hDHFR(I8V, K133E, Y163C)	153	154
hDHFRRDD-39	hDHFR(V9A, S93R, P150L)	155	156
hDHFRRDD-40	hDHFR(K19E, F89L, E181G)	157	158
hDHFRRDD-41	hDHFR(G21E, I72V, I176T)	159	160
hDHFRRDD-42	hDHFR(L23S, V121A, Y157C)	161	162
hDHFRRDD-43	hDHFR(E31D, F32M, V116I)	163	164
hDHFRRDD-44	hDHFR(Q36F, N65F, Y122I)	165	-
hDHFRRDD-45	hDHFR(Q36K, N65F, Y122I)	166	167
hDHFRRDD-46	hDHFR(Q36F, Y122I, A125F)	168	169
hDHFRRDD-47	hDHFR(N49D, F59S, D153G)	170	171
hDHFRRDD-48	hDHFR(V110A, V136M, K177R)	172	173
hDHFRRDD-49	hDHFR(Y122I, H131R, E144G)	174	175
hDHFRRDD-50	hDHFR(2-187 ДТ, I17V, Y122I)	176	177-178
hDHFRRDD-51	hDHFR(2-187 ДТ, G21T, Y122I)	179	180
hDHFRRDD-52	hDHFR(2-187 ДТ, G21T, Y122N)	181	182
hDHFRRDD-53	hDHFR(2-187 ДТ, Q36K, Y122I)	183	184-186
hDHFRRDD-54	hDHFR(2-187 ДТ, M53T, R138I)	187	188
hDHFRRDD-55	hDHFR(2-187 ДТ, L74N, Y122I)	189	190
hDHFRRDD-56	hDHFR(2-187 ДТ, V75F, Y122I)	191	192
hDHFRRDD-57	hDHFR(2-187 ДТ, L94A, T147A)	193	194
hDHFRRDD-58	hDHFR(2-187 ДТ, V121A, Y122I)	195	196
hDHFRRDD-59	hDHFR(2-187 ДТ, Y122I, A125F)	197	198-200
hDHFRRDD-60	hDHFR(2-187 ДТ, Y122I, M140I)	201	202
hDHFRRDD-61	hDHFR(2-187 ДТ, Y122I, N127Y)	203	204
hDHFRRDD-62	hDHFR(2-187 ДТ, H131R, E144G)	205	206
hDHFRRDD-63	hDHFR(2-187 ДТ, E162G, I176F)	207	208
hDHFRRDD-64	hDHFR(G54R, M140V, S168C)	209	-
hDHFRRDD-65	hDHFR(G54R, I115L, M140V, S168C)	210	211
hDHFRRDD-66	hDHFR(V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R)	212	213

hDHFRRDD-67	hDHFR(D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S)	214	215
hDHFRRDD-68	hDHFR(2-187 ДТ, E31D, F32M, V116I)	216	217
hDHFRRDD-69	hDHFR(2-187 ДТ, Q36F, N65F, Y122I)	218	219-220
hDHFRRDD-70	hDHFR(2-187 ДТ, Q36F, Y122I, A125F)	221	222
hDHFRRDD-71	hDHFR(2-187 ДТ, Q36K, N65F, Y122I)	223	224
hDHFRRDD-72	hDHFR(2-187 ДТ, Y122I, H131R, E144G)	225	226
hDHFRRDD-73	hDHFR(2-187 ДТ, D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S)	227	228
hDHFRRDD-74	hDHFR(I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G)	229	230
hDHFRRDD-75	hDHFR(G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R)	231	232
hDHFRRDD-76	hDHFR(K81R, K99R, L100P, E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E)	233	234
hDHFRRDD-77	hDHFR(R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S)	235	236
hDHFRRDD-78	hDHFR(N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L)	237	238
hDHFRRDD-79	hDHFR(F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G)	239	240
hDHFRRDD-80	hDHFR(L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R)	241	242
hDHFRRDD-81	hDHFR(V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S)	243	244
hDHFRRDD-82	hDHFR(L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S)	245	246
hDHFRRDD-83	hDHFR(A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R, I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D, M112V, W114R,	247	248

	Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N)		
hDHFRDD-84	hDHFR(2-187 ДТ, I17A)	249	250
hDHFRDD-85	hDHFR(2-187 ДТ, I17A, Y122I)	251	252
hDHFRDD-86	hDHFR (а.к. 2-187 ДТ, K55R, N65K, Y122I)	6552	6553

**[0071]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из hDHFR, такой как, но не ограничиваясь ими, hDHFRDD-1, hDHFRDD-2, hDHFRDD-3, hDHFRDD-4, hDHFRDD-5, hDHFRDD-6, hDHFRDD-7, hDHFRDD-8, hDHFRDD-9, hDHFRDD-10, hDHFRDD-11, hDHFRDD-12, hDHFRDD-13, hDHFRDD-14, hDHFRDD-15, hDHFRDD-16, hDHFRDD-17, hDHFRDD-18, hDHFRDD-19, hDHFRDD-20, hDHFRDD-21, hDHFRDD-22, hDHFRDD-23, hDHFRDD-24, hDHFRDD-25, hDHFRDD-26, hDHFRDD-27, hDHFRDD-28, hDHFRDD-29, hDHFRDD-30, hDHFRDD-31, hDHFRDD-32, hDHFRDD-33, hDHFRDD-34, hDHFRDD-35, hDHFRDD-36, hDHFRDD-37, hDHFRDD-38, hDHFRDD-39, hDHFRDD-40, hDHFRDD-41, hDHFRDD-42, hDHFRDD-43, hDHFRDD-44, hDHFRDD-45, hDHFRDD-46, hDHFRDD-47, hDHFRDD-48, hDHFRDD-49, hDHFRDD-50, hDHFRDD-51, hDHFRDD-52, hDHFRDD-53, hDHFRDD-54, hDHFRDD-55, hDHFRDD-56, hDHFRDD-57, hDHFRDD-58, hDHFRDD-59, hDHFRDD-60, hDHFRDD-61, hDHFRDD-62, hDHFRDD-63, hDHFRDD-64, hDHFRDD-65, hDHFRDD-66, hDHFRDD-67, hDHFRDD-68, hDHFRDD-69, hDHFRDD-70, hDHFRDD-71, hDHFRDD-72, hDHFRDD-73, hDHFRDD-74, hDHFRDD-75, hDHFRDD-76, hDHFRDD-77, hDHFRDD-78, hDHFRDD-79, hDHFRDD-80, hDHFRDD-81, hDHFRDD-82, hDHFRDD-83, hDHFRDD-84, hDHFRDD-85 и hDHFRDD-86.

6. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из дигидрофолатредуктазы *E. coli* (ecDHFR)

**[0072]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), полученный из белка дигидрофолатредуктазы *E. coli* (ecDHFR) или его фрагмента или варианта.

**[0073]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка ecDHFR. Длина области белка ecDHFR может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130,

131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[0074]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка есDHFR и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. Неограничивающие примеры мутаций включают M1del, R12Y, R12H, G27S, Y100I и E129K.

**[0075]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка есDHFR и он может содержать более одной мутации. Любая из мутаций, перечисленных в данном документе, может быть включена в DRD. Неограничивающие примеры двойных мутаций включают R12Y и Y100I. Неограничивающие примеры тройных мутаций включают M1del, R12Y, Y100I; M1del, R12Y, E129K; и M1del, R12H, E129K. Неограничивающий пример четырех мутаций включает M1del, R12Y, G27S, Y100I.

**[0076]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из есDHFR, могут содержать аминокислоты 2-159 исходной последовательности есDHFR. В данном документе это называется мутацией M1del.

**[0077]** В одном варианте осуществления стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с SRE для посттрансляционной регуляции уровней белка. В одном аспекте лиганды есDHFR триметоприм (TMP) и метотрексат (MTX) используются для стабилизации мутантов есDHFR.

**[0078]** Неограничивающий перечень доменов, чувствительных к лекарственным средствам, полученных из есDHFR (аминокислотных последовательностей и последовательностей

нуклеиновых кислот), приведен в Табл. 3. Положение мутированной аминокислоты, указанной в Табл. 3, указано по отношению к DHFR E. coli (ID в Uniprot: P0ABQ4) SEQ ID NO: 35 (обозначается в Табл. 3 как «ДТ»). В Табл. 3 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в этом положении по отношению к последовательности дикого типа. В Табл. 3 домен, чувствительный к лекарственным средствам, полученный из ecDHFR, содержащий аминокислоты 1-159 исходной последовательности ecDHFR, обозначен как ecDHFR с идентичностью мутаций в скобках, например, ecDHFR (R12Y, Y100I).

**[0079]** Таблица 3: Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DD), полученные из ecDHFR

Идентификатор DRD	Мутации ecDHFR	SEQ ID аминокислоты	SEQ ID нуклеиновой кислоты
ecDHFRDD-1	ecDHFR (R12Y, Y100I)	253	254
ecDHFRDD-2	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12Y, Y100I)	255	256-263
ecDHFRDD-3	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12H, E129K)	264	265-266
ecDHFRDD-4	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12Y, E129K)	267	268
ecDHFRDD-5	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12Y, G27S, Y100I)	269	-
ecDHFRDD-6	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100A)	6554	6555
ecDHFRDD-7	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100C)	6556	6557
ecDHFRDD-8	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100D)	6558	6559
ecDHFRDD-9	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100E)	6560	6561
ecDHFRDD-10	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100F)	6562	6563
ecDHFRDD-11	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100G)	6564	6565
ecDHFRDD-12	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100H)	6566	6567
ecDHFRDD-13	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100I)	6568	6569
ecDHFRDD-14	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100K)	6570	6571
ecDHFRDD-15	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100L)	6572	6573
ecDHFRDD-16	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100M)	6574	6575
ecDHFRDD-17	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100N)	6576	6577
ecDHFRDD-18	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100P)	6578	6579
ecDHFRDD-19	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100Q)	6580	6581
ecDHFRDD-20	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100R)	6582	6583
ecDHFRDD-21	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100S)	6584	6585
ecDHFRDD-22	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100T)	6586	6587

ecDHFRDD-23	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100V)	6588	6589
ecDHFRDD-24	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100W)	6590	6591
ecDHFRDD-25	ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ)	6592	6593

**[0080]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из ecDHFR, такой как, но не ограничиваясь ими, ecDHFRDD-1, ecDHFRDD-2, ecDHFRDD-3, ecDHFRDD-4, ecDHFRDD-5, ecDHFRDD-6, ecDHFRDD-7, ecDHFRDD-8, ecDHFRDD-9, ecDHFRDD-10, ecDHFRDD-11, ecDHFRDD-12, ecDHFRDD-13, ecDHFRDD-14, ecDHFRDD-15, ecDHFRDD-16, ecDHFRDD-17, ecDHFRDD-18, ecDHFRDD-19, ecDHFRDD-20, ecDHFRDD-21, ecDHFRDD-22, ecDHFRDD-23, ecDHFRDD-24 и ecDHFRDD-25.

**[0081]** Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из FK506-связывающего белка (FKBP)

**[0082]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), полученный из FK506-связывающего белка (FKBP) или его фрагмента или варианта.

**[0083]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка FKBP. Длина области белка FKBP может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404,

405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[0084]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка FKBP и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. Неограничивающие примеры мутаций включают M1del, E32G, F37V, R72G, K106E и L109P.

**[0085]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка FKBP он может содержать более одной мутации. Любая из мутаций, перечисленных в данном документе, может быть включена в DD. Неограничивающие примеры двойных мутаций включают M1del, F37V; F37V, L107P. Неограничивающий пример тройных мутаций включает M1del, F37V, L107P. Неограничивающий пример четырех мутаций включает E32G, F37V, R72G, K106E. Неограничивающий пример пяти мутаций включает M1del, E32G, F37V, R72G, K106E.

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из FKBP, могут содержать аминокислоты 2-108 исходной последовательности FKBP. В данном документе это называется мутацией M1del.

**[0087]** В одном варианте осуществления стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с SRE для посттрансляционной регуляции уровней белка. В одном аспекте лиганд FKBP Shield-1 применяется для стабилизации мутантов FKBP.

**[0088]** Неограничивающий перечень доменов, чувствительных к лекарственным средствам, полученных из FKBP (аминокислотных последовательностей и последовательностей нуклеиновых кислот), приведен в Табл. 4. Положение мутированной аминокислоты, указанной в Табл. 4, указано по отношению к FKBP (ID в Uniprot: P62942) SEQ ID NO: 37 (обозначается в Табл. 4 как «ДТ»). В Табл. 4 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в этом положении по отношению к последовательности дикого типа. В Табл. 4 домен, чувствительный к лекарственным средствам, полученный из FKBP, содержащий аминокислоты 1-108 исходной последовательности FKBP, обозначен как FKBP с идентичностью мутаций в скобках, например, FKBP (F37V).

**[0089]** Таблица 4: Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из FKBP

Идентификатор DRD	Мутации FKBP	SEQ ID аминокислоты	SEQ ID нуклеиновой кислоты
FKBPDD-1	FKBP (2-108 ДТ)	270	
FKBPDD-2	FKBP (F37V)	271	

FKBPDD-3	FKBP (2-108 ДТ, F37V)	272	273
FKBPDD-4	FKBP(F37V, L107P)	274	275-276
FKBPDD-5	FKBP(2-108 ДТ, F37V, L107P)	277	278-284
FKBPDD-6	FKBP(E32G, F37V, R72G, K106E)	285	
FKBPDD-7	FKBP(2-108 ДТ, E32G, F37V, R72G, K106E)	286	287-293

**[0090]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из FKBP, такой как, но не ограничиваясь ими, FKBPDD-1, FKBPDD-2, FKBPDD-3, FKBPDD-4, FKBPDD-5, FKBPDD-6 и FKBPDD-7.

7. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из фосфодиэстеразы человека (hPDE)

**[0091]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), полученный из белка фосфодиэстеразы человека (hPDE), такого как, но не ограничиваясь ими, фосфодиэстераза 1A человека (hPDE1A), фосфодиэстераза 1B человека (hPDE1B), фосфодиэстераза 1C человека (hPDE1C), фосфодиэстераза 1D человека (hPDE1D), фосфодиэстераза 2A человека (hPDE2A), фосфодиэстераза 3A человека (hPDE3A), фосфодиэстераза 3B человека (hPDE3B), фосфодиэстераза 4A человека (hPDE4A), фосфодиэстераза 4B человека (hPDE4B), фосфодиэстераза 4C человека (hPDE4C), фосфодиэстераза 4D человека (hPDE4D), фосфодиэстераза 6A человека (hPDE6A), фосфодиэстераза 6B человека (hPDE6B), фосфодиэстераза 6C человека (hPDE6C), фосфодиэстераза 7A человека (hPDE7A), фосфодиэстераза 7B человека (hPDE7B), фосфодиэстераза 8A человека (hPDE8A), фосфодиэстераза 8B человека (hPDE8B), фосфодиэстераза 9A человека (hPDE9A), фосфодиэстераза 10A человека (hPDE10A) и фосфодиэстераза 11A человека (hPDE11A) или их фрагмент или вариант. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE1A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE1B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE1C. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE1D. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE2A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE3A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE3B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE4A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из

hPDE4B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE4C. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE4D. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE6A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE6B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE6C. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE7A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE7B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE8A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE8B. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE9A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE10A. В качестве неограничивающего примера SRE содержит по меньшей мере один DD, полученный из hPDE11A.

**[0092]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка hPDE. Длина области белка hPDE может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-

50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[0093]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка PDE и он может содержать по меньшей мере одну мутацию.

**[0094]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка PDE5 и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. Неограничивающие примеры мутаций включают E535D, E536G, Q541R, S542L, V548M, P549S, S550F, L554R, K555R, I556S, F559L, S560G, F561L, S562G, F564L, F564S, F564I, L569M, T571S, T571I, L573M, C574Y, V585A, V585M, N587S, Q586L, Q586P, Q589E, K591E, H592R, V594I, I599V, K604R, K604E, N605D, N605Y, R607W, R607Q, K608E, N609H, N609Y, A611T, Y612F, Y612W, Y612A, H613L, H613R, W615R, H617L, N620S, M625I, K630R, K633E, N636S, I648V, H653A, D656L, R658H, G659A, N661S, N662Y, S663Y, S663P, Q666H, L675P, Y676D, Y676N, C677R, H678R, I680S, E682A, D687A, H685L, M691I, L693P, I700F, I706N, E708V, Y709H, K710N, T711A, T712S, T712M, I715K, A722V, T723S, T723R, D724Y, D724A, D724N, D724G, L727P, Y728L, K730E, R732L, R732G, R732A, R732V, R732I, R732P, R732F, R732W, R732Y, R732H, R732S, R732T, R732D, R732E, R732Q, R732N, R732M, R732C, R732K, F735L, F736A, F736G, F736L, F736M, F736R, F736W, F736K, F736Q, F736E, F736S, F736P, F736V, F736C, F736Y, F736H, F736I, F736N, F736D, F736T, L738H, N742S, Q743L, F744L, L746S, F755L, F755Y, M758I, M760I, A762T, A762S, D764N, D764G, D764V, D764A, S766F, A767E, I768N, K770Q, W772C, A779T, L781P, T784I, F787V, F787A, K795E, E795R, K795N, E796G, E796D, L797F, I799L, I799T, T802P, D803N, L804P, E808G, S815C, M816A, M816T, F820I, I821A, A823T, I824T, Y829A, T833S, C839S, F840S, R847G, R847T, K848N, K852E, W853F, E858V и Q859R.

**[0095]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка PDE5 он может содержать более одной мутации. Любая из мутаций, перечисленных в данном документе, может быть включена в DD. Неограничивающие примеры двойных мутаций включают Y612A, R732L; Y612F, R732L; Y612W, R732L; Y709H, F787V; Y728L, D764N; L569M, T833S; D724A, R732L; D724G, D764G; D724G, K848N; E682A, R732L; F736A, D764N; G659A, T784I; H617L, A722V; H653A, R732L; I556S, E796D; I700F, E796G; K770Q, K848N; L573M, F735L; N605Y, I715K; N609Y, I799L; R732L, D764A; R732L, D764N; R732L, F736A; S550F, L554R; V548M, D803N; V548M, F820I. Неограничивающие примеры тройных мутаций включают A722V, F755L, M760I; F561L, G659A, T784I; H613L, D724Y, F755Y; L554R, Q589E, A823T; L554R, Q589E, M691I; S542L, E708V, W772C; S562G, L727P, R847T; T571S, V585M, T723S; T712M, M758I, Q859R. Неограничивающие примеры четырех мутаций включают L554R, Q586P, K710N, K730E; Q586L, S663Y, A762T, E808G; T571I, K604R, I706N, E795R; W615R, T723R, A762T, E808G. Неограничивающие примеры пяти мутаций включают F564I, N662Y, H685L, L693P, F736I; P549S, F564I, R658H, A779T, R847G.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из PDE5, могут содержать аминокислоты 2-875 исходной последовательности PDE5. В данном документе это называется

мутацией M1del.

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления DRD получают из области белка PDE5. В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 535-860 hPDE5 (SEQ ID NO: 43). В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 535-830 hPDE5 (SEQ ID NO: 44). В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 535-836 hPDE5 (SEQ ID NO: 45). В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 567-860 hPDE5 (SEQ ID NO: 46). В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 590-836 hPDE5 (SEQ ID NO: 47). В качестве неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 590-860 hPDE5 (SEQ ID NO: 48).

**[0098]** В одном варианте осуществления стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с SRE для посттрансляционной регуляции уровней белка. В одном аспекте лиганды PDE5 силденафил, варденафил или тадалафил применяют для стабилизации мутантов PDE5.

**[0099]** Неограничивающий перечень доменов, чувствительных к лекарственным средствам, полученных из PDE5 (аминокислотных последовательностей и последовательностей нуклеиновых кислот), приведен в Табл. 5. Положение мутированной аминокислоты, указанной в Табл. 5, указано по отношению к PDE5 (ID в Uniprot: O76074) SEQ ID NO: 1. В Табл. 5 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в этом положении по отношению к последовательности дикого типа.

**[00100]** Таблица 5: Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из PDE5

Идентификатор DRD	Область и мутации PDE5	SEQ ID аминокислоты	SEQ ID нуклеиновой кислоты
PDE5DD-1	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, W853F)	294	295
PDE5DD-2	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I821A)	296	297
PDE5DD-3	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y829A)	298	299
PDE5DD-4	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F787A)	300	301
PDE5DD-5	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736A)	302	303-305
PDE5DD-6	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y728L)	306	307
PDE5DD-7	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L)	308	309-312
PDE5DD-8	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, M625I)	313	314
PDE5DD-9	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D656L)	315	316
PDE5DD-10	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E535D)	317	-
PDE5DD-11	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E536G)	318	-
PDE5DD-12	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q541R)	319	-
PDE5DD-13	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K555R)	320	-
PDE5DD-14	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F559L)	321	-
PDE5DD-15	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F561L)	322	-
PDE5DD-16	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F564L)	323	-
PDE5DD-17	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F564S)	324	-
PDE5DD-18	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K591E)	325	-
PDE5DD-19	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N587S)	326	-
PDE5DD-20	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K604E)	327	-
PDE5DD-21	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K608E)	328	-
PDE5DD-22	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N609H)	329	-
PDE5DD-23	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K630R)	330	-
PDE5DD-24	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K633E)	331	-
PDE5DD-25	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N636S)	332	-
PDE5DD-26	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N661S)	333	334
PDE5DD-27	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y676D)	335	-
PDE5DD-28	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y676N)	336	-
PDE5DD-29	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, C677R)	337	-
PDE5DD-30	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H678R)	338	-
PDE5DD-31	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D687A)	339	-
PDE5DD-32	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T712S)	340	-

PDE5DD-33	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724N)	341	-
PDE5DD-34	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724G)	342	-
PDE5DD-35	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L738H)	343	-
PDE5DD-36	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N742S)	344	-
PDE5DD-37	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, A762S)	345	-
PDE5DD-38	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D764N)	346	-
PDE5DD-39	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D764G)	347	-
PDE5DD-40	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D764V)	348	-
PDE5DD-41	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S766F)	349	-
PDE5DD-42	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K795E)	350	-
PDE5DD-43	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L797F)	351	-
PDE5DD-44	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I799T)	352	-
PDE5DD-45	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T802P)	353	-
PDE5DD-46	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S815C)	354	-
PDE5DD-47	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, M816A)	355	-
PDE5DD-48	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I824T)	356	-
PDE5DD-49	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, C839S)	357	-
PDE5DD-50	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K852E)	358	-
PDE5DD-51	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S560G)	359	-
PDE5DD-52	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, V585A)	360	-
PDE5DD-53	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I599V)	361	-
PDE5DD-54	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I648V)	362	-
PDE5DD-55	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S663P)	363	-
PDE5DD-56	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L675P)	364	-
PDE5DD-57	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T711A)	365	-
PDE5DD-58	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F744L)	366	-
PDE5DD-59	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L746S)	367	-
PDE5DD-60	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F755L)	368	-
PDE5DD-61	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L804P)	369	-
PDE5DD-62	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, M816T)	370	-
PDE5DD-63	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F840S)	371	-
PDE5DD-64	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732G)	372	373-374
PDE5DD-65	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732A)	375	376-377
PDE5DD-66	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732V)	378	379-380

PDE5DD-67	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732I)	381	382-383
PDE5DD-68	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732P)	384	385-386
PDE5DD-69	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732F)	387	388
PDE5DD-70	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732W)	389	390
PDE5DD-71	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732Y)	391	392-393
PDE5DD-72	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732H)	394	395-396
PDE5DD-73	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732S)	397	398-399
PDE5DD-74	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732T)	400	401-402
PDE5DD-75	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732D)	403	404-405
PDE5DD-76	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732E)	406	407-408
PDE5DD-77	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732Q)	409	410-411
PDE5DD-78	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732N)	412	413-414
PDE5DD-79	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732M)	415	416
PDE5DD-80	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732C)	417	418-419
PDE5DD-81	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732K)	420	421
PDE5DD-82	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H653A)	422	423
PDE5DD-83	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D764A)	424	425
PDE5DD-84	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R658H)	426	427
PDE5DD-85	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q666H)	428	429
PDE5DD-86	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L781P)	430	431
PDE5DD-87	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, A767E)	432	433
PDE5DD-88	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q743L)	434	435
PDE5DD-89	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, V594I)	436	437
PDE5DD-90	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H592R)	438	439
PDE5DD-91	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E858V)	440	441
PDE5DD-92	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T784I)	442	443
PDE5DD-93	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736G)	444	445
PDE5DD-94	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736L)	446	447
PDE5DD-95	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736M)	448	449
PDE5DD-96	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736R)	450	451
PDE5DD-97	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736W)	452	453
PDE5DD-98	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736K)	454	455
PDE5DD-99	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736Q)	456	457
PDE5DD-100	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736E)	458	459

PDE5DD-101	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736S)	460	461
PDE5DD-102	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736P)	462	463
PDE5DD-103	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736V)	464	465
PDE5DD-104	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736I)	466	467
PDE5DD-105	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736C)	468	469
PDE5DD-106	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736Y)	470	471
PDE5DD-107	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736H)	472	473
PDE5DD-108	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736N)	474	475
PDE5DD-109	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736D)	476	477
PDE5DD-110	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736T)	478	479
PDE5DD-111	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I680S)	480	481
PDE5DD-112	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, A611T)	482	483
PDE5DD-113	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I768N)	484	485
PDE5DD-114	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R607W)	486	487
PDE5DD-115	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N620S)	488	489
PDE5DD-116	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, C574Y)	490	491
PDE5DD-117	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H613R)	492	493
PDE5DD-118	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K795N)	494	495
PDE5DD-119	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N605D)	496	497
PDE5DD-120	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I799L)	498	499
PDE5DD-121	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R607Q)	500	501
PDE5DD-122	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E682A)	502	503
PDE5DD-123	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724A)	504	505
PDE5DD-124	PDE5 (а.к. 590-860 ДТ, R732L)	506	507
PDE5DD-125	PDE5 (а.к. 567-860 ДТ, R732L)	508	509
PDE5DD-126	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732G)	510	511
PDE5DD-127	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732A)	512	513
PDE5DD-128	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732V)	514	515
PDE5DD-129	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732I)	516	517
PDE5DD-130	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732P)	518	519
PDE5DD-131	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732F)	520	521
PDE5DD-132	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732W)	522	523
PDE5DD-133	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732Y)	524	525
PDE5DD-134	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732H)	526	527

PDE5DD-135	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732S)	528	529
PDE5DD-136	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732T)	530	531
PDE5DD-137	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732D)	532	533
PDE5DD-138	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732E)	534	535
PDE5DD-139	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732Q)	536	537
PDE5DD-140	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732N)	538	539
PDE5DD-141	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732M)	540	541
PDE5DD-142	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732C)	542	543
PDE5DD-143	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732K)	544	545
PDE5DD-144	PDE5 (а.к. 590-836 ДТ, R732L)	546	547
PDE5DD-145	PDE5 (а.к. 535-836 ДТ, R732L)	548	549
PDE5DD-146	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y612F, R732L)	550	551
PDE5DD-147	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y612W, R732L)	552	553
PDE5DD-148	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y612A, R732L)	554	555
PDE5DD-149	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F736A, D764N)	556	557
PDE5DD-150	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, D764N)	558	559
PDE5DD-151	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, F736A)	560	561-562
PDE5DD-152	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H653A, R732L)	563	564
PDE5DD-153	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, D764A)	565	566
PDE5DD-154	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L573M, F735L)	567	568
PDE5DD-155	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y709H, F787V)	569	570
PDE5DD-156	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N605Y, I715K)	571	572
PDE5DD-157	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I700F, E796G)	573	574
PDE5DD-158	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724G, K848N)	575	576
PDE5DD-159	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I556S, E796D)	577	578
PDE5DD-160	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L569M, T833S)	579	580
PDE5DD-161	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, V548M, D803N)	581	582
PDE5DD-162	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, G659A, T784I)	583	584
PDE5DD-163	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H617L, A722V)	585	586
PDE5DD-164	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N609Y, I799L)	587	588
PDE5DD-165	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K770Q, K848N)	589	590
PDE5DD-166	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, V548M, F820I)	591	592
PDE5DD-167	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S550F, L554R)	593	594
PDE5DD-168	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724G, D764G)	595	596

PDE5DD-169	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y728L, D764N)	597	598
PDE5DD-170	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E682A, R732L)	599	600
PDE5DD-171	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, D724A, R732L)	601	602
PDE5DD-172	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S562G, L727P, R847T)	603	604
PDE5DD-173	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T571S, V585M, T723S)	605	606
PDE5DD-174	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, A722V, F755L, M760I)	607	608
PDE5DD-175	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S542L, E708V, W772C)	609	610
PDE5DD-176	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T712M, M758I, Q859R)	611	612
PDE5DD-177	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H613L, D724Y, F755Y)	613	614
PDE5DD-178	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L554R, Q589E, M691I)	615	616
PDE5DD-179	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L554R, Q589E, A823T)	617	618
PDE5DD-180	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F561L, G659A, T784I)	619	620
PDE5DD-181	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, W615R, T723R, A762T, E808G)	621	622
PDE5DD-182	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L554R, Q586P, K710N, K730E)	623	624
PDE5DD-183	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q586L, S663Y, A762T, E808G)	625	626
PDE5DD-184	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T571I, K604R, I706N, E795R)	627	628
PDE5DD-185	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F564I, N662Y, H685L, L693P, F736I)	629	630
PDE5DD-186	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, P549S, F564I, R658H, A779T, R847G)	631	632
PDE5DD-187	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732D, F736S)	6406	6407
PDE5DD-188	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732E, F736D)	6408	6409
PDE5DD-189	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732V, F736G)	6410	6411
PDE5DD-190	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732W, F736G)	6412	6413
PDE5DD-191	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732W, F736V)	6414	6415
PDE5DD-192	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732L, F736W)	6416	6417
PDE5DD-193	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732P, F736Q)	6418	6419
PDE5DD-194	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732A, F736A)	6420	6421
PDE5DD-195	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732S, F736G)	6422	6423
PDE5DD-196	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732T, F736P)	6424	6425
PDE5DD-197	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732M, F736H)	6426	6427

PDE5DD-198	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732Y, F736M)	6428	6429
PDE5DD-199	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732P, F736D)	6430	6431
PDE5DD-200	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732P, F736G)	6432	6433
PDE5DD-201	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732W, F736L)	6434	6435
PDE5DD-202	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732L, F736S)	6436	6437
PDE5DD-203	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732D, F736T)	6438	6439
PDE5DD-204	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732L, F736V)	6440	6441
PDE5DD-205	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732G, F736V)	6442	6443
PDE5DD-206	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, R732W, F736A)	6444	6445
PDE5DD-207	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, C574N)	6446	6447
PDE5DD-208	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, E536K, I739W)	6448	6449
PDE5DD-209	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, H678F, S702F)	6450	6451
PDE5DD-210	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, E669G, I700T)	6452	6453
PDE5DD-211	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, G632S, I648T)	6454	6455
PDE5DD-212	PDE5 (а.к. 535 - 774 ДТ, L646S)	6456	6457
PDE5DD-213	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, A762V)	6458	6459
PDE5DD-214	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, D640N)	6460	6461
PDE5DD-215	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, N636S)	6462	6463
PDE5DD-216	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, Q623R, D654G, K741N)	6464	6465
PDE5DD-217	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, A673T, L756V, C846Y)	6466	6467
PDE5DD-218	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, V660A, L781F, R794G, C825R, E858G)	6468	6469
PDE5DD-219	PDE5 (а.к. 535 - 860 ДТ, E642G, G697D, I813T)	6470	6471
PDE5DD-220	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, M758T)	6472	6473
PDE5DD-221	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K752E)	6474	6475
PDE5DD-222	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, C677Y, H685R, A722V)	6476	6477
PDE5DD-223	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T639S, M816R)	6478	6479
PDE5DD-224	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, T537A, D558G, I706T, F744L, D764N)	6480	6481
PDE5DD-225	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q586R, D724G)	6482	6483
PDE5DD-226	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F686S)	6484	6485
PDE5DD-227	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E539G, L738I)	6486	6487
PDE5DD-228	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Q635R, E753K, I813T)	6488	6489
PDE5DD-229	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L672P, S836L)	6490	6491
PDE5DD-230	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, M691T, D764N)	6492	6493

PDE5DD-231	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R807G)	6494	6495
PDE5DD-232	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R577Q, C596R, V660A, I715V, E785K, L856P)	6496	6497
PDE5DD-233	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I720V, F820S)	6498	6499
PDE5DD-234	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S695G, E707K, I739M, C763R)	6500	6501
PDE5DD-235	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y709H, K812R, L832P)	6502	6503
PDE5DD-236	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, N583S, K752E, C846S)	6504	6505
PDE5DD-237	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E682G, D748N)	6506	6507
PDE5DD-238	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K591R, I643T, L856P)	6508	6509
PDE5DD-239	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F619S, V818A, Y829C)	6510	6511
PDE5DD-240	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, V548E, Q589L, K633I, M681T, S702I, K752E, L781P, A857T)	6512	6513
PDE5DD-241	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, S652G, Q688R)	6514	6515
PDE5DD-242	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, E565G)	6516	6517
PDE5DD-243	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, I774V)	6518	6519
PDE5DD-244	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, K591R)	6520	6521
PDE5DD-245	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, F559S, Y709C, M760T)	6522	6523
PDE5DD-246	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, A649V, A650T, K730E, E830K)	6524	6525
PDE5DD-247	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, Y728C, Q817R)	6526	6527
PDE5DD-248	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, L595P, K741R)	6528	6529
PDE5DD-249	PDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R577W, W615R, M805T, I821V)	6530	6531

**[00101]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из PDE5, такой как, но не ограничиваясь ими, PDE5DD-1, PDE5DD-2, PDE5DD-3, PDE5DD-4, PDE5DD-5, PDE5DD-6, PDE5DD-7, PDE5DD-8, PDE5DD-9, PDE5DD-10, PDE5DD-11, PDE5DD-12, PDE5DD-13, PDE5DD-14, PDE5DD-15, PDE5DD-16, PDE5DD-17, PDE5DD-18, PDE5DD-19, PDE5DD-20, PDE5DD-21, PDE5DD-22, PDE5DD-23, PDE5DD-24, PDE5DD-25, PDE5DD-26, PDE5DD-27, PDE5DD-28, PDE5DD-29, PDE5DD-30, PDE5DD-31, PDE5DD-32, PDE5DD-33, PDE5DD-34, PDE5DD-35, PDE5DD-36, PDE5DD-37, PDE5DD-38, PDE5DD-39, PDE5DD-40, PDE5DD-41, PDE5DD-42, PDE5DD-43, PDE5DD-44, PDE5DD-45, PDE5DD-46, PDE5DD-47, PDE5DD-48, PDE5DD-49, PDE5DD-50, PDE5DD-51, PDE5DD-52, PDE5DD-53, PDE5DD-54, PDE5DD-55, PDE5DD-56,

PDE5DD-57, PDE5DD-58, PDE5DD-59, PDE5DD-60, PDE5DD-61, PDE5DD-62, PDE5DD-63, PDE5DD-64, PDE5DD-65, PDE5DD-66, PDE5DD-67, PDE5DD-68, PDE5DD-69, PDE5DD-70, PDE5DD-71, PDE5DD-72, PDE5DD-73, PDE5DD-74, PDE5DD-75, PDE5DD-76, PDE5DD-77, PDE5DD-78, PDE5DD-79, PDE5DD-80, PDE5DD-81, PDE5DD-82, PDE5DD-83, PDE5DD-84, PDE5DD-85, PDE5DD-86, PDE5DD-87, PDE5DD-88, PDE5DD-89, PDE5DD-90, PDE5DD-91, PDE5DD-92, PDE5DD-93, PDE5DD-94, PDE5DD-95, PDE5DD-96, PDE5DD-97, PDE5DD-98, PDE5DD-99, PDE5DD-100, PDE5DD-101, PDE5DD-102, PDE5DD-103, PDE5DD-104, PDE5DD-105, PDE5DD-106, PDE5DD-107, PDE5DD-108, PDE5DD-109, PDE5DD-110, PDE5DD-111, PDE5DD-112, PDE5DD-113, PDE5DD-114, PDE5DD-115, PDE5DD-116, PDE5DD-117, PDE5DD-118, PDE5DD-119, PDE5DD-120, PDE5DD-121, PDE5DD-122, PDE5DD-123, PDE5DD-124, PDE5DD-125, PDE5DD-126, PDE5DD-127, PDE5DD-128, PDE5DD-129, PDE5DD-130, PDE5DD-131, PDE5DD-132, PDE5DD-133, PDE5DD-134, PDE5DD-135, PDE5DD-136, PDE5DD-137, PDE5DD-138, PDE5DD-139, PDE5DD-140, PDE5DD-141, PDE5DD-142, PDE5DD-143, PDE5DD-144, PDE5DD-145, PDE5DD-146, PDE5DD-147, PDE5DD-148, PDE5DD-149, PDE5DD-150, PDE5DD-151, PDE5DD-152, PDE5DD-153, PDE5DD-154, PDE5DD-155, PDE5DD-156, PDE5DD-157, PDE5DD-158, PDE5DD-159, PDE5DD-160, PDE5DD-161, PDE5DD-162, PDE5DD-163, PDE5DD-164, PDE5DD-165, PDE5DD-166, PDE5DD-167, PDE5DD-168, PDE5DD-169, PDE5DD-170, PDE5DD-171, PDE5DD-172, PDE5DD-173, PDE5DD-174, PDE5DD-175, PDE5DD-176, PDE5DD-177, PDE5DD-178, PDE5DD-179, PDE5DD-180, PDE5DD-181, PDE5DD-182, PDE5DD-183, PDE5DD-184, PDE5DD-185, PDE5DD-186, PDE5DD-187, PDE5DD-188, PDE5DD-189, PDE5DD-190, PDE5DD-191, PDE5DD-192, PDE5DD-193, PDE5DD-194, PDE5DD-195, PDE5DD-196, PDE5DD-197, PDE5DD-198, PDE5DD-199, PDE5DD-200, PDE5DD-201, PDE5DD-202, PDE5DD-203, PDE5DD-204, PDE5DD-205, PDE5DD-206, PDE5DD-207, PDE5DD-208, PDE5DD-209, PDE5DD-210, PDE5DD-211, PDE5DD-212, PDE5DD-213, PDE5DD-214, PDE5DD-215, PDE5DD-216, PDE5DD-217, PDE5DD-218, PDE5DD-219, PDE5DD-220, PDE5DD-221, PDE5DD-222, PDE5DD-223, PDE5DD-224, PDE5DD-225, PDE5DD-226, PDE5DD-227, PDE5DD-228, PDE5DD-229, PDE5DD-230, PDE5DD-231, PDE5DD-232, PDE5DD-233, PDE5DD-234, PDE5DD-235, PDE5DD-236, PDE5DD-237, PDE5DD-238, PDE5DD-239, PDE5DD-240, PDE5DD-241, PDE5DD-242, PDE5DD-243, PDE5DD-244, PDE5DD-245, PDE5DD-246, PDE5DD-247, PDE5DD-248 и PDE5DD-249.

8. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DD), полученные из PPAR гамма (PPAR $\gamma$ )

**[00102]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DD), полученный из PPAR гамма (PPAR $\gamma$ ) или его фрагмента или варианта.

**[00103]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка PPAR $\gamma$ . Длина области

белка PPAR $\alpha$  может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

9. Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DRD), полученные из эстрогенового рецептора (ER)

**[00104]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), полученный из эстрогенового рецептора (ER) или его фрагмента или варианта.

**[00105]** В одном варианте осуществления SRE содержит область белка ER. Длина области белка ER может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153,

154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот. Длина области исходного белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот.

**[00106]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка ER и он может содержать по меньшей мере одну мутацию. Неограничивающие примеры мутаций включают K303R, N304S, T371A, L384M, M421G, N519S, G521G, Y537S.

**[00107]** В одном варианте осуществления DRD можно получать из белка ER он может содержать более одной мутации. Любая из мутаций, перечисленных в данном документе, может быть включена в DRD. Неограничивающий пример четырех мутаций включает L384M, M421G, G521R, Y537S. Неограничивающий пример шести мутаций включает T371A, L384M, M421G, N519S, G521R и Y537S. Неограничивающий пример восьми мутаций включают K303R, N304S, T371A, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S.

**[00108]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из ER, могут содержать аминокислоты 2-595 исходной последовательности ER. В данном документе это называется мутацией M1del.

**[00109]** В одном варианте осуществления стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с SRE для посттрансляционной регуляции уровней белка.

**[00110]** В некоторых вариантах осуществления DRD, полученные из ER, могут содержать аминокислоты 2-875 исходной последовательности ER. В данном документе это называется мутацией M1del.

**[00111]** В некоторых вариантах осуществления DD получают из области белка ER. В качестве

неограничивающего примера, область представляет собой аминокислоту 305-549 ER (SEQ ID NO: 76).

**[00112]** Неограничивающий перечень доменов, чувствительных к лекарственным средствам, полученных из ER (аминокислотных последовательностей и последовательностей нуклеиновых кислот), приведен в Табл. 6. Положение мутированной аминокислоты, указанной в Табл. 6, указано по отношению к ER (ID в Uniprot: P03372.2) SEQ ID NO: 42. В Табл. 6 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в этом положении по отношению к последовательности дикого типа.

**[00113]** Таблица 6: Домены, чувствительные к лекарственным средствам (DD), полученные из ER

Идентификатор DRD	Области и мутации ER	SEQ ID аминокислоты	SEQ ID нуклеиновой кислоты
ERDD-1	ER (а.к. 305-549 ДТ, T371A, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S)	633	634-636
ERDD-2	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, G521R, Y537S)	637	638-640
ERDD-3	ER (а.к. 303-549 ДТ, K303R, N304S, T371A, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S)	641	-
ERDD-6	ER (а.к. 305-549 ДТ, R335G, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S)	642	643
ERDD-7	ER (а.к. 305-549 ДТ, R335G, L384M, M421G, G521R, E523G, Y537S, A546T)	644	645
ERDD-8	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M; M421G; T431I; G521R, Y537S)	646	647
ERDD-9	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S)	648	649
ERDD-10	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S)	650	651
ERDD-11	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502R, G521R, Y537S)	652	653
ERDD-12	ER (а.к. 305-549 ДТ, S305N, L384M, M421G, G442V, G521R, Y537S)	654	655
ERDD-13	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413F, M421G, G521R, Y537S)	656	657
ERDD-14	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413L, M421G, G521R, Y537S)	658	659
ERDD-15	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413Y, M421G, G521R, Y537S)	660	661
ERDD-16	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413H, M421G, G521R, Y537S)	662	663
ERDD-17	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413Q, M421G, G521R, Y537S)	664	665
ERDD-18	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413I, M421G, G521R, Y537S)	666	667
ERDD-19	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413M, M421G, G521R, Y537S)	668	669
ERDD-20	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413K, M421G, G521R, Y537S)	670	671

ERDD-21	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413V, M421G, G521R, Y537S)	672	673
ERDD-22	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413S, M421G, G521R, Y537S)	674	675
ERDD-23	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413C, M421G, G521R, Y537S)	676	677
ERDD-24	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413W, M421G, G521R, Y537S)	678	679
ERDD-25	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413P, M421G, G521R, Y537S)	680	681
ERDD-26	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413R, M421G, G521R, Y537S)	682	683
ERDD-27	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413T, M421G, G521R, Y537S)	684	685
ERDD-28	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413A, M421G, G521R, Y537S)	686	687
ERDD-29	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413E, M421G, G521R, Y537S)	688	689
ERDD-30	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413G, M421G, G521R, Y537S)	690	691
ERDD-31	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502F, G521R, Y537S)	692	693
ERDD-32	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502L, G521R, Y537S)	694	695
ERDD-33	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502Y, G521R, Y537S)	696	697
ERDD-34	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502H, G521R, Y537S)	698	699
ERDD-35	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502I, G521R, Y537S)	700	701
ERDD-36	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502M, G521R, Y537S)	702	703
ERDD-37	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502N, G521R, Y537S)	704	705
ERDD-38	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502K, G521R, Y537S)	706	707
ERDD-39	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502V, G521R, Y537S)	708	709
ERDD-40	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502S, G521R, Y537S)	710	711
ERDD-41	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502C, G521R, Y537S)	712	713
ERDD-42	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502W, G521R, Y537S)	714	715
ERDD-43	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502P, G521R, Y537S)	716	717
ERDD-44	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502T, G521R, Y537S)	718	719
ERDD-45	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502A, G521R, Y537S)	720	721
ERDD-46	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502D, G521R, Y537S)	722	723
ERDD-47	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502E, G521R, Y537S)	724	725
ERDD-48	ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, M421G, Q502G, G521R, Y537S)	726	727

**[00114]** В одном варианте осуществления SRE может содержать по меньшей мере один домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), полученный от ER, такой как, но не ограничиваясь ими, ERDD-1, ERDD-2, ERDD-3, ERDD-6, ERDD-7, ERDD-8, ERDD-9, ERDD-10, ERDD-11, ERDD-12, ERDD-13, ERDD-14, ERDD-15, ERDD-16, ERDD-17, ERDD-18, ERDD-19, ERDD-20, ERDD-21, ERDD-22, ERDD-23, ERDD-24, ERDD-25, ERDD-26, ERDD-27, ERDD-28, ERDD-29, ERDD-30, ERDD-31, ERDD-32, ERDD-33, ERDD-34, ERDD-35, ERDD-36, ERDD-37,

ERDD-38, ERDD-39, ERDD-40, ERDD-41, ERDD-42, ERDD-43, ERDD-44, ERDD-45, ERDD-46, ERDD-47 и ERDD-48.

**[00115]** В некоторых вариантах осуществления ERDD может содержать одну или несколько мутаций, выбранных из, но не ограничиваясь ими, N413T, N413H, N413A, N413Q, N413V, N413C, N413K, N413M, N413R, N413S, N413W, N413I, N413E, N413L, N413P, N413F, N413Y, N413G, Q502D, Q502H, Q502E, Q502V, Q502A, Q502T, Q502N, Q502K, Q502S, Q502L, Q502Y, Q502W, Q502F, Q502I, Q502G, Q502P, Q502M, Q502C, L384M, M421G, G521R, Y537S, K303R, N304S, S305N, R335G, T371A, T431I, N519S, E523G, A546T и G442V.

**[00116]** В настоящем изобретении представлены композиции, которые содержат эффекторный модуль с SRE, полученными из всего или части исходного белка, такого как PDE5 и первую полезную нагрузку, которая содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или его мутант. В одном варианте осуществления SRE содержит аминокислоты 535-860 PDE5. В некоторых вариантах осуществления SRE может содержать одну или несколько мутаций по сравнению с исходным белком. SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, SEQ ID NO: 294, 296, 298, 300, 302, 306, 308, 313, 315, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 389, 391, 394, 397, 400, 403, 406, 409, 412, 415, 417, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 563, 565, 567, 569, 571, 573, 575, 577, 579, 581, 583, 585, 587, 589, 591, 593, 595, 597, 599, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 6406, 6408, 6410, 6412, 6414, 6416, 6418, 6420, 6422, 6424, 6426, 6428, 6430, 6432, 6434, 6436, 6438, 6440, 6442, 6444, 6446, 6448, 6450, 6452, 6454, 6456, 6458, 6460, 6462, 6464, 6466, 6468, 6470, 6472, 6474, 6476, 6478, 6480, 6482, 6484, 6486, 6488, 6490, 6492, 6494, 6496, 6498, 6500, 6502, 6504, 6506, 6508, 6510, 6512, 6514, 6516, 6518, 6520, 6522, 6524, 6526, 6528 или 6530.

**[00117]** В одном варианте осуществления SRE содержит мутацию R732L, а SRE может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308.

**[00118]** SRE, описанный в данном документе, может реагировать или взаимодействовать по меньшей мере с одним стимулом. В одном аспекте стимул может представлять собой малую молекулу, такую как, но не ограничиваясь ими, варденафил, тадалафил или силденафил. В одном аспекте малая молекула представляет собой варденафил.

**[00119]** В некоторых аспектах эффекторный модуль может содержать линкер. Такой линкер может функционально связать SRE с первой полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой линкер, содержащий глицин и серин, или линкер,

известный из уровня техники, например, в любой одной или нескольких из следующих публикаций, WO 2018/161000; WO 2018/231759; WO 2019/241315; WO 2018/160993; WO 2018/237323; и WO 2018/161038. В одном варианте осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6532.

**[00120]** В одном варианте осуществления эффекторный модуль может содержать SEQ ID NO: 6534.

**[00121]** В данном документе также предложены полинуклеотиды, кодирующие композиции, описанные в данном документе, а также векторы, кодирующие полинуклеотиды. В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, которые включают композиции, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель, а также иммунные клетки, экспрессирующие композиции, описанные в данном документе.

**[00122]** В данном документе также предложен способ уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта. Способы могут включать стадии введения субъекту терапевтически эффективного количества иммунных клеток. Иммунные клетки могут содержать или экспрессировать композицию, содержащую элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или его мутант. Иммунная клетка может также экспрессировать фармацевтическую композицию, которая содержит композиции, описанные в данном документе. Способы также включают введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула. В одном варианте осуществления стимул представляет собой лиганд. Лиганд может модулировать экспрессию первой полезной нагрузки с уменьшением опухолевой нагрузки. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой варденафил, тадалафил, силденафил, Shield-1 или триметоприм.

**[00123]** В настоящем изобретении также предложены способы активации дендритных клеток у субъекта. Способы могут включать стадии введения субъекту терапевтически эффективного количества иммунных клеток. Иммунные клетки могут содержать или экспрессировать композицию, содержащую элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или его мутант. Иммунная клетка может также экспрессировать фармацевтическую композицию, которая содержит композиции, описанные в данном документе. Способы также включают введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула. В одном варианте осуществления стимул представляет собой лиганд. Способы дополнительно могут включать измерение маркера активации дендритных клеток IL12 у субъекта в ответ на лиганд для определения активации дендритных клеток. В одном варианте осуществления дендритная клетка может представлять собой миелоидную дендритную клетку, плазматическую дендритную клетку,

CD14+ дендритную клетку, клетку Лангерганса или микроглию. В одном аспекте дендритная клетка представляет собой миелоидную дендритную клетку.

**[00124]** Композиции, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать CAR. CAR может содержать (a) внеклеточный целевой фрагмент; (b) трансмембранный домен; (c) внутриклеточный сигнальный домен; и (d) необязательно один или несколько костимулирующих доменов. Внеклеточный целевой фрагмент CAR может представлять собой scFv. В одном варианте осуществления scFv может представлять собой scFv CD19. В некоторых вариантах осуществления может присутствовать костимулирующий домен.

#### 10. Стимулы настраиваемых систем экспрессии белка

**[00125]** Настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению может быть чувствительной к стимулу.

**[00126]** В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой лиганд. Лиганды могут быть на основе нуклеиновых кислот, на основе белков, на основе липидов, органические, неорганические или представлять собой любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления лиганды могут представлять собой синтетические молекулы. В некоторых вариантах осуществления лиганды могут представлять собой низкомолекулярные терапевтические соединения. В некоторых вариантах осуществления лиганды могут представлять собой низкомолекулярные лекарственные средства, ранее одобренными регулирующим органом, таким как FDA.

**[00127]** Как описано в настоящем изобретении, настраиваемая система экспрессии белка может проявлять лиганд-зависимую активность. Лиганд может связываться с DRD и стабилизировать присоединенный или функционально связанный белок, представляющий интерес. Лиганды, которые, как известно, связывают кандидатные DRD, могут быть исследованы в отношении их влияния на активность настраиваемой системы экспрессии белка.

**[00128]** В некоторых вариантах осуществления лиганд является клеточно-проницаемым. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть липофильным для улучшения проницаемости в клетку.

**[00129]** В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой малую молекулу. Низкомолекулярный лиганд может быть клинически одобрен как безопасный и обладающий соответствующей фармацевтической кинетикой и распределением.

**[00130]** В некоторых вариантах осуществления лиганд может образовывать комплекс или связываться с одной или несколькими другими молекулами, такими как, но не ограничиваясь ими, другой лиганд, белок, пептид, нуклеиновая кислота, липид, производное липида, стерол, стероид, метаболит, производное метаболита или малая молекула. В некоторых вариантах осуществления

стимул лиганда образует комплекс или связан с одним или несколькими другими видами и/или количеством других молекулами. В некоторых вариантах осуществления стимул лиганда представляет собой мультимер лиганда того же типа. В некоторых вариантах осуществления мультимер, представляющий собой стимул лиганда, содержит 2, 3, 4, 5, 6 или более мономеров.

#### 11. Лиганды DHFR

**[00131]** В некоторых вариантах осуществления лиганд по настоящему изобретению связывается с дигидрофолатредуктазой. В некоторых вариантах осуществления лиганд связывается и ингибирует функцию дигидрофолатредуктазы и в данном документе обозначается ингибитором дигидрофолата.

**[00132]** В некоторых вариантах осуществления лиганд может представлять собой селективный ингибитор DHFR человека. Лиганды по настоящему изобретению также могут представлять собой селективные ингибиторы дигидрофолатредуктаз бактерий и паразитических организмов, таких как *Pneumocystis* spp., *Toxoplasma* spp., *Trypanosoma* spp., *Mycobacterium* spp. и *Streptococcus* spp. Лиганды, специфичные для других DHFR, можно модифицировать для улучшения связывания с дигидрофолатредуктазой человека.

**[00133]** Примеры ингибиторов дигидрофолатов включают, но не ограничиваясь ими, триметоприм (TMP), метотрексат (MTX), пралатрексат, пиритрексим, пириметамин, талотрексин, хлорогуанид, пентамидин, триметрексат, аминоптерин, C1 898 тригидрохлорид, пеметрексед динатрий, ралтитрексед, сульфагуанидин, флотин, иклаприм и диаверидин.

**[00134]** В некоторых вариантах осуществления лиганды по настоящему изобретению могут включать дигидрофолиевую кислоту или любые ее производные, которые могут связываться с DHFR человека. В некоторых вариантах осуществления лиганды по настоящему изобретению могут представлять собой 2,4-диаминогетероциклические соединения. В некоторых вариантах осуществления 4-оксогруппа в дигидрофолате может быть модифицирована для образования ингибиторов DHFR. В одном примере 4-оксогруппа может быть заменена 4-аминогруппой. Различные диаминогетероциклы, включая птеридины, хиназолины, пиридопиримидины, пиримидины и триазины, также могут быть использованы в качестве каркаса для разработки ингибиторов DHFR и могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением.

**[00135]** В некоторых вариантах осуществления лиганды включают лиганды, полученные из TMP, содержащие части лиганда, которые, как известно, опосредуют связывание с DHFR. Лиганды также можно модифицировать для уменьшения нецелевого связывания с другими ферментами метаболизма фолиевой кислоты и увеличения специфического связывания с DHFR.

#### 12. Лиганды ER

**[00136]** В некоторых вариантах осуществления лиганд по настоящему изобретению связывается с ER. Лиганды могут представлять собой агонистов или антагонистов. В некоторых вариантах

осуществления лиганд связывается с ER и ингибирует его функцию и в данном документе обозначается ингибитором ER. В некоторых вариантах осуществления лиганд может представлять собой селективный ингибитор ER человека. Лиганды по настоящему изобретению также могут быть селективными ингибиторами ER других молекул. Лиганды, специфичные для других ER, можно модифицировать для улучшения связывания с ER человека.

**[00137]** Лиганды могут представлять собой агонистов ER, таких как, но не ограничиваясь ими, эндогенный эстроген 17 $\beta$ -эстрадиол (E2) и синтетический нестероидный эстроген диэтилстильбестрол (DES). В некоторых вариантах осуществления лиганды могут представлять собой антагонистов ER, таких как ICI-164,384, RU486, тамоксифен, 4-гидрокси тамоксифен (4-OHT), фулвестрант, оремифен, лазофоксифен, кломифен, фемарелле и ормелоксифен и ралоксифен (RAL).

**[00138]** В некоторых вариантах осуществления стимулятор по настоящему изобретению может представлять собой антагонисты ER, такие как, но не ограничиваясь ими, базедоксифен и/или ралоксифен.

В некоторых вариантах осуществления лиганды включают лиганды, полученные из базедоксифена, содержащие части лиганда, которые, как известно, опосредуют связывание с ER. Лиганды также можно модифицировать для уменьшения нецелевого связывания с другими ферментами метаболизма фолиевой кислоты и увеличения специфического связывания с DRD, полученными из ER.

### 13. Лиганды фосфодиэстеразы

**[00139]** В некоторых вариантах осуществления лиганды по настоящему изобретению связываются с фосфодиэстеразами. В некоторых вариантах осуществления лиганды связываются с фосфодиэстеразой и ингибируют ее функцию и в данном документе они обозначаются ингибиторы фосфодиэстеразы.

**[00140]** В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой малую молекулу, которая связывается с фосфодиэстеразой 5. В одном варианте осуществления малая молекула представляет собой ингибитор hPDE5. Примеры ингибиторов hPDE5 включают, но не ограничиваясь ими, силденафил, варденафил, тадалафил, аванафил, лоденафил, мироденафил, уденафил, бензамиденафил, дазантафил, беминафил, SLx-2101, LAS 34179, UK-343,664, UK-357903, UK-371800 и BMS-341400.

**[00141]** В некоторых вариантах осуществления лиганды включают лиганды, полученные из силденафила, содержащие части лиганда, которые, как известно, опосредуют связывание с hPDE5. Лиганды также можно модифицировать для уменьшения связывания с нецелевыми фосфодиэстеразами и увеличения специфического связывания с hPDE5.

**[00142]** В некоторых вариантах осуществления стимул может представлять собой лиганд,

который связывается более чем с одной фосфодиэстеразой. В одном варианте осуществления стимул представляет собой ингибитор всех видов фосфодиэстеразы, который может связываться с двумя или более hPDE, такими как аминофиллин, параксантин, пентоксифиллин, теобромин, дипиридамола, теофиллин, запринаст, икариин, CDP-840, этазолат и глауцин.

#### 14. Лиганды FKBP

**[00143]** В некоторых вариантах осуществления лиганды по настоящему изобретению связываются с FKBP, включая FKBP человека. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой SLF или Shield-1.

#### 15. Коэффициент стабилизации и дестабилизации

**[00144]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модуляции белка, экспрессии, функции или уровня путем измерения степени стабилизации и степени дестабилизации. В контексте данного документа коэффициент стабилизации может быть определен как соотношение экспрессии, функции или уровня белка, представляющего интерес, в ответ на стимул в отношении экспрессии, функции или уровня белка, представляющего интерес, в отсутствие стимула, специфичного для SRE. В некоторых вариантах осуществления коэффициент стабилизации составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-95, 20-100, 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-95, 30-100, 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-95, 40-100, 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-95, 50-100, 60-70, 60-80, 60-90, 60-95, 60-100, 70-80, 70-90, 70-95, 70-100, 80-90, 80-95, 80-100, 90-95, 90-100 или 95-100. В контексте данного документа коэффициент дестабилизации может быть определен как соотношение экспрессии, функции или уровня белка, представляющего интерес, в отсутствие стимула, специфичного для эффекторного модуля, в отношении экспрессии, функции или уровня белка, представляющего интерес, т.е. экспрессируемого конститутивно и в отсутствие стимула, специфичного для SRE. В контексте данного документа термин «конститутивно» относится к экспрессии, функции или уровню белка, представляющего интерес, который не связан с SRE и, следовательно, экспрессируется как в присутствии, так и в отсутствие стимула. В некоторых аспектах коэффициент дестабилизации составляет по меньшей мере 0, например, по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, или по меньшей мере 0-0,1, 0-0,2, 0-0,3, 0-0,4, 0-0,5, 0-0,6, 0-0,7, 0-0,8, 0-0,9, 0,1-0,2, 0,1-0,3, 0,1-0,4, 0,1-0,5, 0,1-0,6, 0,1-0,7, 0,1-0,8, 0,1-0,9, 0,2-0,3, 0,2-0,4, 0,2-0,5, 0,2-0,6, 0,2-0,7, 0,2-0,8, 0,2-0,9, 0,3-0,4, 0,3-0,5, 0,3-0,6, 0,3-0,7, 0,3-0,8, 0,3-0,9, 0,4-0,5, 0,4-0,6, 0,4-0,7, 0,4-0,8, 0,4-0,9, 0,5-0,6, 0,5-0,7, 0,5-0,8, 0,5-0,9, 0,6-0,7, 0,6-0,8, 0,6-0,9, 0,7-0,8, 0,7-0,9 или 0,8-0,9.

**[00145]** В некоторых вариантах осуществления SRE эффекторного модуля может стабилизировать полезную нагрузку, представляющую интерес, при коэффициенте стабилизации 1 или больше, при этом коэффициент стабилизации может включать соотношение экспрессии, функции или уровня полезной нагрузки, представляющей интерес, в присутствии стимула в

отношении экспрессии, функции или уровня полезной нагрузки в отсутствие стимула.

**[00146]** В некоторых вариантах осуществления SRE может дестабилизировать иммунотерапевтическое средство при коэффициенте дестабилизации от 0 до 0,09, при этом коэффициент дестабилизации может включать соотношение экспрессии, функции или уровня полезной нагрузки в отсутствие стимула, специфичного для SRE, в отношении экспрессии, функции или уровня полезной нагрузки, которая выражается конститутивно, и в отсутствие стимула, специфичного для SRE.

#### 16. Дополнительные характеристики эффекторного модуля

**[00147]** Эффекторный модуль по настоящему изобретению может дополнительно содержать дополнительные компоненты, которые могут быть функционально связаны либо с DRD, либо с полезной нагрузкой, либо с обоими. В некоторых вариантах осуществления дополнительные компоненты могут включать в себя сигнальную последовательность, которая регулирует распределение полезной нагрузки, представляющей интерес, функцию расщепления и/или процессинга, которая облегчает отщепление полезной нагрузки от конструкции эффекторного модуля, нацеливание и/или проникновение сигнала, который может регулируют клеточную локализацию эффекторного модуля, метки и/или одной или нескольких линкерных последовательностей, которые связывают различные компоненты эффекторного модуля, регуляторные элементы, последовательности полиаденилирования, трансмембранные домены, внутривостовые домены, шарниры, метки, сайт расщепления, лидерные последовательности. Примеры таких дополнительных компонентов эффекторного модуля описаны в WO 2018/161000; WO 2018/231759; WO 2019/241315; WO 2018/160993; WO 2018/237323; и WO 2018/161038. В одном варианте осуществления область трансмембранного домена первой полезной нагрузки может быть заменена трансмембранным доменом, его вариантом или фрагментом из второго исходного белка.

#### 17. Полезные нагрузки

**[00148]** В контексте данного документа термин «полезная нагрузка» или «белок, представляющий интерес» (используемый в данном документе взаимозаменяемо) означает любой полипептид, белок или его часть, которые связаны, присоединены или функционально связаны с DRD по настоящему изобретению.

**[00149]** Полезные нагрузки могут содержать любой полипептид или любой белок или их фрагмент. Полезная нагрузка может представлять собой последовательность дикого типа, фрагмент последовательности дикого типа и/или содержать одну или несколько мутаций. Полезная нагрузка может представлять собой природный белок из генома организма или его варианты, мутанты и производные. Природный белок может быть получен, например, из организма млекопитающего, бактерии и вируса. Полезная нагрузка может представлять собой белок или полипептид, кодируемым рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, гибридным или химерным полипептидом, или полипептидом, который функционирует в виде части белкового комплекса.

**[00150]** В одном примере полезная нагрузка может представлять собой полипептид, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты из генома человека.

**[00151]** В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может представлять собой вариантную последовательность исходного полипептида. В некоторых аспектах вариантная последовательность может иметь такую же или аналогичную активность, что и референтная последовательность. В качестве альтернативы вариант может иметь измененную активность (например, повышенную или пониженную) по сравнению с референтной последовательностью. Как правило, варианты конкретного полипептида по настоящему изобретению будут на по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее чем на 100% идентичны последовательности этого конкретного референтного полипептида, как определено программами выравнивания последовательностей, известными специалистам в данной области техники.

#### 18. Терапевтические средства в качестве полезных нагрузок

**[00152]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой терапевтические средства. Например, полезная нагрузка может представлять собой терапевтическое средство для лечения рака, терапевтическое средство для лечения аутоиммунного заболевания, иммунотерапевтическое средство, противовоспалительное средство, антипатогенное средство или средство генной терапии. В некоторых аспектах иммунотерапевтическое средство может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, рецептор TCR, химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор химерного переключателя, антагонист коингибирующей молекулы, агонист костимулирующей молекулы, цитокин, цитокиновый рецептор, хемокин, хемокиновый рецептор, фактор метаболизма, фактор коагуляции, фермент, хоминг-рецептор и переключатель безопасности.

**[00153]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки могут представлять собой иммунотерапевтические средства, которые вызывают иммунные ответы в организме. Иммунотерапевтическое средство может представлять собой, но не ограничиваясь ими, антитело и его фрагменты и варианты, химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор химерного переключателя, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, слитый полипептид цитокин-цитокиновый рецептор или любое средство, которое индуцирует иммунный ответ, и может включать любое средство, которое изменяет активность, функцию или ответ иммунной клетки. В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство индуцирует противораковый иммунный ответ в клетке или у субъекта.

#### 19. Цитокины, хемокины и другие растворимые факторы в качестве полезных нагрузок

**[00154]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины, хемокины, факторы роста и растворимые белки, продуцируемые иммунными клетками, раковыми клетками и другими типами клеток, которые

выступают в качестве химических коммуникаторов между клетками и тканями в организме. Эти белки опосредуют широкий спектр физиологических функций, от эффектов в отношении роста, дифференцировки, миграции и выживания клеток до ряда эффекторных активностей. Например, активированные Т-клетки продуцируют различные цитокины, выполняющие цитотоксическую функцию для устранения опухолевых клеток.

**[00155]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины и их фрагменты, варианты, аналоги и производные, включая, но не ограничиваясь ими, интерлейкины, факторы некроза опухоли (TNF), интерфероны (IFN), TGF бета и хемокины. В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины, которые стимулируют иммунные ответы. В других вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой антагонисты цитокинов, которые отрицательно влияют на противораковые иммунные ответы.

**[00156]** Например, трансмембранный домен первой полезной нагрузки может быть заменен любым трансмембранным доменом, его вариантами или фрагментами.

**[00157]** В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может представлять собой слитый белок, содержащий любой из описанных иммунотерапевтических средств и убиквитин. В слитом белке убиквитин может располагаться на N-конце, а иммунотерапевтическое средство может располагаться на C-конце. В одном аспекте иммунотерапевтическое средство может самое по себе представлять слитый белок, а убиквитин может располагаться между белками, которые являются слитыми. Полезная нагрузка может содержать один убиквитиновый белок или цепочку убиквитиновых белков. Убиквитиновый белок может быть связан с иммунотерапевтическим средством посредством одной аминокислоты.

## 20. Иммунотерапевтические средства

**[00158]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки могут представлять собой иммунотерапевтические средства, которые вызывают иммунные ответы в организме. Иммунотерапевтическое средство может представлять собой, но не ограничиваясь ими, антитело и его фрагменты и варианты, химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор химерного переключателя, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, слитый полипептид цитокин-цитокиновый рецептор или любое средство, которое индуцирует иммунный ответ. В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство индуцирует противораковый иммунный ответ в клетке или у субъекта.

## 21. CD40L

**[00159]** В различных вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению содержат иммунотерапевтическое средство. В различных вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство представляет собой лиганд CD40 (CD40L), также известный как

CD154 или TNFRF5, или мутант, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, делеций или добавлений к последовательности CD40L дикого типа человека. CD40L принадлежит к суперсемейству TNF и в основном экспрессируется на Т-клетках. CD40L связывается с CD40, экспрессируемым множеством иммунных клеток, и инициирует каскад клеточных ответов в зависимости от типа клеток. CD40L может также связываться с интегрином  $\alpha 5\beta 1$  и интегрином  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ . CD40L представляет собой мембранный полипептид II типа, имеющий цитоплазматический домен на своем N-конце, трансмембранную область, а затем внеклеточный домен на своем C-конце. В некоторых вариантах осуществления CD40L по настоящему изобретению может быть сконструирован так, чтобы связываться только с одним из своих партнеров по связыванию, например, CD40. В некоторых аспектах CD40L, описанный в данном документе, может быть способен связываться со всеми своими когнатными партнерами по связыванию.

**[00160]** Если не указано иное, полноразмерный CD40L обозначается в данном документе как «CD40L». Нуклеотидная и аминокислотная последовательность CD40L от мыши и человека хорошо известна из уровня техники и может быть найдена, например, в патентах США № 5962406 (Armitage et al.). В понятие лиганда CD40 также включены варианты последовательности, включая консервативные замены аминокислот и т.п., которые не изменяют способность лиганда вызывать иммунный ответ на муцин.

**[00161]** CD40L может связываться с CD40, экспрессируемым, но не ограничиваясь ими, в антигенпрезентирующих клетках (APC), В-клетках, моноцитах, макрофагах, тромбоцитах, нейтрофилах, дендритных клетках, эндотелиальных клетках и  $\alpha \text{SMC}$  (гладкомышечных клетках). Связывание CD40L с CD40, экспрессируемым на дендритных клетках, может способствовать лицензированию дендритных клеток (DC). DC могут быть преобразованы в функциональное состояние антигенспецифической Т-клеткой-хелпером для активации цитотоксических CD8+ Т-клеток, этот процесс называется лицензированием DC. Привлечение CD40 на DC приводит к стимуляции DC, о чем свидетельствует поверхностная экспрессия костимулирующих молекул и молекул МНС; продуцирование провоспалительных цитокинов (например, IL12 и TNF), а также распространение эпитопа.

**[00162]** В некоторых вариантах осуществления CD40L, регулируемый настраиваемыми системами экспрессии белка, описанными в данном документе, можно использовать для терапии солидных иммуногенных опухолей. CD40L может повышать эффективность целевых Т-клеток солидных опухолей в иммуногенных опухолях путем активации адаптивных и врожденных иммунных ответов *in situ*. Регулируемые биоконтурные системы на основе CD40L, описанные в данном документе, могут быть желательными, поскольку экспрессия эндогенного CD40L в Т-клетках является временной. Кроме того, микроокружение опухоли богато шеддазами, которые могут расщеплять эндогенный CD40L, экспрессируемый Т-клетками. Экспрессия экзогенно экспрессируемого конститутивного CD40L может приводить к токсичности для печени и

чрезмерной пролиферации В-клеток, приводящей к лимфомам (Schmitz et al (2006) *Hepatology* 44(2):430-9, Vonderheide et al (2007) *J Clin Oncol.* 1; 25(7):876-83, Sacco et al (2000) *Cancer Gene Ther.*; 7(10):1299-306); содержание каждого из которых включено посредством ссылки в полном объеме). Конститутивная (нерегулируемая) экспрессия может приводить к CRS, тромбоэмболическим синдромам, аутоиммунным реакциям, AICD вследствие гипериммунной стимуляции и ангиогенезу опухоли, тем самым создавая потребность в биоконтурах, описанных в настоящем изобретении.

**[00163]** В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство может представлять собой мультимер молекул CD40L, такой как, но не ограничиваясь ими, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, септамер или гептамер. В одном варианте осуществления CD40L может образовывать тример. Мультимеризация CD40L может усиливать передачу сигналов посредством оси CD40L/CD40. Связывание тримерного CD40L с CD40 также может инициировать кластеризацию CD40 и активацию TRAF, что в конечном итоге приводит к активации NF-κB.

**[00164]** CD40L, описанный в данном документе, может быть устойчивым к протеиназам и шеддазам, таким как те, которые обнаруживаются в микроокружении опухоли, например, ADAM10 или ADAM17. Повышенная активность ADAM17 в микроокружении опухоли была ассоциирована с уменьшением передачи сигналов посредством оси CD40/CD40L (см. Lowe and Corvaia (2016), *Int J Cancer Clin Res*, 3:058; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме).

**[00165]** В некоторых аспектах CD40L может коэкспрессироваться с химерным антигенным рецептором. CD40L, экспрессируемый на CAR T-клетках, может усиливать функцию CAR T-клеток и фоновых эффекторных клеток посредством активации CD40+ иммунных клеток, таких как, но не ограничиваясь ими, дендритные клетки, макрофаги, миелоидные клетки, В-клетки, тромбоциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и фибробласты в микроокружении опухоли, а также сами опухолевые клетки. В одном варианте осуществления полезная нагрузка может представлять собой бицистронную конструкцию, содержащую CD40L и CD19CAR с костимулирующими доменами CD28 и CD3Zeta (см. Curran et al. (2015) *Mol Ther.* 23: 4; 769–778; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме).

**[00166]** В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению также могут быть сконструированы для экспрессии химерных антигенных рецепторов, описанных в данном документе, в сочетании с CD40L. CD40L может экспрессироваться конститутивно или может использоваться в качестве полезной нагрузки в эффекторных модулях по настоящему изобретению. CD40L участвует в презентации антигена дендритных клеток; продуцировании IL-12 и выработке CD8+ Т-клеточного иммунитета. Любой из способов, описанных Curren et al., для повышения противоопухолевой эффективности CAR с помощью CD40L может быть применимым в настоящем изобретении (Curren et al. *Mol Ther.* 2015 Apr; 23(4): 769–778; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления в настоящем изобретении могут быть применимы агонистические антитела к CD40. Моноклональные антитела к CD40

показали клиническую активность в отсутствие токсичности, приводящей к инвалидности.

**[00167]** Комбинация Т-регуляторных клеток, миелоидных супрессорных клеток (MDSC) и экстенсивных стромальных сетей в микроокружении опухоли (TME) может ослаблять противоопухолевый иммунный ответ, предупреждая инфильтрацию и/или активацию Т-клеток с помощью современных иммунотерапевтических средств (см. Ma et al. Агонист CD40 и антагонистическое антитело к PD-1 перепрограммируют микроокружение неиммуногенных опухолей с обеспечением опосредованной Т-клетками противораковой активности. *Cancer Immunol Res* Jan. 14, 2019; doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0061; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Современные виды лечения на основе CAR Т-клеток неэффективны, поскольку терапевтические средства обладают подавлением иммунитета, ускользанием от опухолевого антигена, недостаточной экспансией CAR Т-клеток и токсичностью для здоровых тканей.

**[00168]** В настоящем изобретении эти проблемы рассматриваются с использованием эффекторного модуля с CD40L в качестве иммунотерапевтического средства, слитого прямо или косвенно с SRE, содержащим DRD, описанный в данном документе. CD40L может быть не единственным иммунотерапевтическим средством в эффекторном модуле. Эффекторный модуль может также содержать конструкцию CAR. Комбинация CD40L и CAR в качестве иммунотерапевтического средства и SRE может вызывать любое из следующего в отдельности или в комбинации: (1) реполяризацию CD40 + макрофагов в микроокружении опухоли до провоспалительного состояния, (2) активацию CD40+ дендритных клеток для ускорения распространения эпитопа, что может уменьшать ускользание опухолевого антигена (например, уменьшать потерю целевых антигенов CAR), (3) обратную передачу сигналов и продуцирование цитокинов для усиления антигензависимой Т-клеточной экспансии и (4) регулируемое продуцирование белка из SRE, что снижает токсичность терапевтического средства для здоровых тканей. В качестве неограничивающего примера, эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством CAR, может быть использован для преодоления потери целевых антигенов CAR (например, ускользания антигена), заставляя дендритные клетки рекрутировать лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), что приводит к экспансии группы противоопухолевых специфических Т-клеток. В качестве неограничивающего примера эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством CAR, может быть использован для уменьшения ограничения опухолевого микроокружения (TME) солидных опухолей путем реполяризации опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM) от супрессивного к воспалительному фенотипу. В качестве неограничивающего примера эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством CAR, можно использовать для увеличения CAR Т-клеточной экспансии, вызывая антигензависимую Т-клеточную экспансию.

**[00169]** В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство. В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство представляет собой CD40L. В одном варианте осуществления эффекторный модуль содержит два или более иммунотерапевтических средства, которые могут быть одного типа, например, два антитела, или разных типов, например, CD40L и конструкция CAR.

**[00170]** В данном документе предложены композиции для индукции иммунного ответа в клетке или у субъекта. Композиции могут содержать эффекторный модуль. Эффекторный модуль может содержать элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820). В одном варианте осуществления первая полезная нагрузка представляет собой весь CD40L (SEQ ID NO: 3820).

**[00171]** В одном аспекте первая полезная нагрузка представляет собой весь CD40L (SEQ ID NO: 3820). В одном аспекте область CD40L может содержать аминокислоты 113-269 из SEQ ID NO: 3820 (SEQ ID NO: 3822). В одном варианте осуществления область CD40L может содержать аминокислоты 12-261 из SEQ ID NO: 3820 (SEQ ID NO: 3824). В одном варианте осуществления область CD40L может содержать аминокислоты 14-261 из SEQ ID NO: 3820 с делецией в аминокислотах 110-116 SEQ ID NO: 3820 (SEQ ID NO: 3826).

**[00172]** SRE эффекторного модуля можно получить из всего или части по меньшей мере одного исходного белка, при этом указанный исходный белок выбран из группы, состоящей из ER, есDHFR, FKBP, PDE5 и hDHFR.

**[00173]** В одном варианте осуществления SRE может содержать одну или несколько мутаций по сравнению с исходным белком.

**[00174]** В одном варианте осуществления SRE можно получить из ER, и SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, аминокислотные последовательности, приведенные в Табл. 6.

**[00175]** В одном варианте осуществления SRE можно получить из есDHFR, и SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, аминокислотные последовательности, приведенные в Табл. 3.

**[00176]** В одном варианте осуществления SRE можно получить из FKBP, и SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, аминокислотные последовательности, приведенные в Табл. 4.

**[00177]** В одном варианте осуществления SRE можно получить из PDE5, и SRE может содержать, но не ограничиваясь ими, аминокислотные последовательности, приведенные в Табл. 5.

**[00178]** В некоторых аспектах SRE может реагировать или взаимодействовать по меньшей мере с одним стимулом. В одном аспекте эффекторный модуль может содержать полезную нагрузку. В одном варианте осуществления вторая полезная нагрузка может представлять собой иммунотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство может представлять собой химерный антигенный рецептор (CAR). CAR, описанный в

данном документе, может содержать (a) внеклеточный целевой фрагмент; (b) трансмембранный домен; (c) внутриклеточный сигнальный домен; и (d) необязательно один или несколько костимулирующих доменов.

**[00179]** Внеклеточный целевой фрагмент CAR может представлять собой scFv. В некоторых аспектах внеклеточный целевой фрагмент может представлять собой scFv. В одном варианте осуществления scFv может представлять собой scFv CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен.

**[00180]** В данном документе также предложен полинуклеотид, кодирующий композиции из описанного в данном документе вектора, экспрессирующего полинуклеотид, а также фармацевтическая композиция, которая включает композиции, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

**[00181]** В настоящем изобретении также предложена иммунная клетка для различных способов лечения, раскрытых в данном документе, например, для лечения рака и переноса адаптивных клеток, которые экспрессируют фармацевтические композиции. Иммунная клетка может представлять собой, например, Т-клетку (например, CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку), естественную клетку-киллер (NK), НКТ-клетку, цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (TIL), Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку (Treg), клетку-киллер, индуцированную цитокинами (CIK), дендритную клетку, эмбриональную стволовую клетку человека, мезенхимальную стволовую клетку, гемопоэтическую стволовую клетку или их смесь. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой дендритную клетку. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку. В одном аспекте иммунная клетка представляет собой CD4<sup>+</sup> Т-клетку.

**[00182]** В данном документе также предложены способы индукции иммунного ответа у субъекта. Такие способы могут включать введение субъекту эффективного количества иммунных клеток, описанных в данном документе. Иммунная клетка, при этом иммунная клетка экспрессирует эффекторный модуль, содержащий элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека. SRE, экспрессируемые иммунной клеткой, могут реагировать или взаимодействовать по меньшей мере с одним стимулом. Способ может дополнительно включать воздействие на субъекта стимула, вызывающего модуляцию экспрессии CD40L. Модуляция экспрессии CD40L индуцирует иммунный ответ. В некоторых аспектах способ может дополнительно включать введение субъекту эффективного количества CD40 положительных клеток. В некоторых аспектах CD40 положительная клетка может представлять собой дендритную клетку, макрофаг, миелоидную клетку, В-клетку, тромбоцит, эндотелиальную клетку,

эпителиальную клетку и фибробласт.

**[00183]** Композиции, описанные в данном документе, можно использовать для индукции иммунного ответа. Такие композиции могут содержать (а) первую иммунную клетку, способную экспрессировать эффекторный модуль, который содержит CD40L (SEQ ID NO: 3820) или мутант CD40L в качестве своей первой полезной нагрузки; а также вторую иммунную клетку, экспрессирующую CD40L. Первая иммунная клетка и вторая иммунная клетка могут быть независимо выбраны из Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки), естественной клетки-киллера (NK), NKT-клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), лимфоцита, инфильтрирующего опухоль (TIL), Т-клетки памяти, регуляторной Т-клетки (Treg), клетки-киллера, индуцированной цитокинами (CIK), дендритной клетки, эмбриональной стволовой клетки человека, мезенхимальной стволовой клетки, гемопоэтической стволовой клетки, дендритной клетки, макрофага, миелоидной клетки, В-клетки, тромбоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки и фибробласта.

**[00184]** В настоящем изобретении также предложены способы активации дендритных клеток у субъекта. Способы могут включать стадии введения субъекту терапевтически эффективного количества иммунных клеток. Иммунные клетки могут содержать или экспрессировать композицию, содержащую элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. Первая полезная нагрузка может содержать полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или мутанта CD40L, описанного в данном документе. Иммунная клетка может также экспрессировать фармацевтическую композицию, которая содержит композиции, описанные в данном документе. Способы также включают введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула. В одном варианте осуществления стимул представляет собой лиганд. Способы дополнительно могут включать измерение маркера активации дендритных клеток IL12 у субъекта в ответ на лиганд для определения активации дендритных клеток. В одном варианте осуществления дендритная клетка может представлять собой миелоидную дендритную клетку, плазматическую дендритную клетку, CD14+ дендритную клетку, клетку Лангерганса или микроглию. В одном аспекте дендритная клетка представляет собой миелоидную дендритную клетку.

**[00185]** В одном варианте осуществления CD40L или его мутант, иммунотерапевтическое средство можно получить из ID в UniProt: P29965 (также обозначаемого в данном документе «ДТ»). Полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой область или часть CD40L с мутацией или без мутации в аминокислотной или нуклеотидной последовательности, кодирующей такой мутант. Неограничивающие примеры областей CD40L содержат, но не ограничиваясь ими, аминокислоты 113-269 из ID в UniProt: P2996, при этом цитоплазматический домен, трансмембранный домен и часть внеклеточного домена удалены из ID UniProt: P2996, оставляя интактной часть внеклеточного домена и рецептор-связывающего домена. В одном варианте осуществления полезная нагрузка может представлять собой аминокислоты 14-261 из ID

UniProt: P2996, которая исключает цитоплазматический хвост CD40L, тем самым потенциально может снижать интернализацию. В одном аспекте полезная нагрузка может представлять собой аминокислоты 14-261 из ID в UniProt: P2996 с делецией в аминокислотах S110-G116, что делает CD40L устойчивым к расщеплению протеолитическими ферментами.

**[00186]** В некоторых вариантах осуществления мутации могут быть сконструированы в полезной нагрузке CD40L таким образом, что она не связывается или не связывается с пониженной аффинностью с CD40L, эндогенно экспрессируемым клетками, описанными в данном документе. CD40L представляет собой трансмембранный белок II типа, который образует тример на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления тримеризация происходит посредством взаимодействия аминокислотных остатков 47-261 SEQ ID NO: 3820. В некоторых вариантах осуществления остатки в 47-261 SEQ ID NO: 3820 могут быть мутированы в полезной нагрузке CD40L для предупреждения тримеризации (в данном документе обозначаемые «мутантами тримеризации»). В некоторых вариантах осуществления остатки в пределах 116-261 SEQ ID NO: 3820 могут быть мутированы. В некоторых аспектах мутации могут допускать селективную тримеризацию таким образом, что мутант тримеризации CD40L может быть способен связываться с другим мутантным белком тримеризации CD40L, но не с белком CD40L, лишенным мутаций. Сайты мутаций тримеризации могут представлять собой сайты в белке CD40L, которые участвуют в тримеризации, что определяется кристаллической структурой тримера CD40L. Положения в CD40L, которые могут быть мутированы, содержат, но не ограничиваясь ими, аминокислоты в положениях 125, 170, 172, 224, 226 и/или 227 в SEQ ID NO: 3820. В некоторых вариантах осуществления мутации полезной нагрузки CD40L для предупреждения его тримеризации с эндогенным CD40L могут содержать, но не ограничиваясь ими, Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W и/или G227F.

**[00187]** Шеддазы, например, ADAM10/17, присутствующие в микроокружении опухоли, могут расщеплять CD40L, тем самым предупреждая успешную активацию CD40 с помощью CD40L. Анализ последовательности CD40L выявляет сайт протеолитического расщепления ADAM10/17. В некоторых вариантах осуществления делеция аминокислот 1-13 CD40L может быть сконструирована для уменьшения интернализации. Делеция аминокислот 110-116 CD40L также может быть сконструирована для удаления сайтов ADAM10/17. Делецию или мутацию остатка метионина в положении 113 аминокислоты CD40L также можно использовать для уменьшения расщепления ферментами ADAM10/17. В одном варианте осуществления область или часть белка CD40L человека может быть заменена последовательностью белка CD40L мыши с образованием белка CD40L, устойчивого к расщеплению ADAM10/17. Любая из последовательностей CD40L, направленных на снижение его отщепления, как описано в публикации патента США US20180085451A1 и/или патенте США US 7495090B2, может использоваться в эффекторных модулях и биоконтурах, описанных в данном документе (содержание каждой из которых включено

посредством ссылки в полном объеме). CD40L может быть связан с мембраной с помощью любого из трансмембранных доменов. В одном варианте осуществления CD40L может быть связан с мембраной с помощью доменов, полученных из CD8, таких как, но не ограничиваясь ими, трансмембранный домен CD8, шарнирный домен CD8 и/или цитоплазматический хвост CD8.

**[00188]** В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули, описанные в данном документе, могут содержать один или несколько сайтов расщепления между DD и CD40L. Включение сайтов расщепления может разъединять протеолитический оборот DD и полезной нагрузки, тем самым изменяя уровни экспрессии полезной нагрузки, независимые от DD. В некоторых вариантах осуществления добавление сайта расщепления может увеличивать экспрессию полезной нагрузки. В других аспектах добавление сайта расщепления может снижать экспрессию полезной нагрузки.

**[00189]** В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка CD40L и SRE, описанные в данном документе, могут быть связаны.

**[00190]** Компоненты конструкции CD40L и конструкции CD40L представлены в Табл. 7 и Табл. 8 соответственно. В Табл. 7 и 8 CD40L «ДТ» относится к ID в Uniprot: P29965, hPDE5 «ДТ» относится к ID в Uniprot: O76074 и ER «ДТ» относится к ID Uniprot: P03372.2.

**[00191]** Таблица 7: Компоненты конструкции CD40L

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO аминокислоты:	Последовательность или SEQ ID NO нуклеиновой кислоты:
Линкер (MH)	MH	-	ATGCAT
Гибкий линкер с высоким содержанием G/S; сайт BamH1	GS	-	GGATCC; GGATCT; GGATCA
Линкер (SG)	SG	-	TCAGGG
Линкер (EF)	EF	-	GAATTC
Линкер (GSSG)	GSSG	3814	3816
Линкер (GSGGGSGGGSG)	GGSGGGSGGGSG	6532	6533; 6594-6597
Линкер (H)	H	-	CAT
Гибкий линкер с высоким содержанием G/S; сайт	GS	-	GGTTCC, GGATCC,

BamH1			GGTTCA, GGATCT, GGATCA, GGTAGT
Линкер (GSG) (BamH1-Gly)	GSG	-	GGATCCG GA, GGATCCG GT, GGATCTG GT;
Сигнальная последовательность IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	1230	1234; 3817;3818
Лидерная последовательность CD8 $\alpha$	MALPVTALLLPLALLLHAARP	870	871
ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDD RVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLP KAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR	255	263
FKBP (2-108 ДТ, F37V, L107P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGK KVDSSRDRNPKPFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE LLKPE	277	3819
hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L)	EETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSDFELSDLE TALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKK NYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMAALKAGKIQN KLTDLLEILALLIAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHP LAQLYCHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSI EEYKTTLKIKQAILATDLALYIKRLGEFFELIRKN QFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQ RIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKN KIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGC RKNRQKWQALAEQQ	308	309-312
hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, F736A)	EETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSDFELSDLE TALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKK	560	561-562

	<p>NYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQN  KLTDLEILALLIAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHP  LAQLYCHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSI  EEYKTLKIIKQAILATDLALYIKRLGEFAELIRKN  QFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQ  RIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKN  KIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGC  RKNRQKWQALAEQQ</p>		
<p>PDE5 (a.k. 535-860 ДТ,  H653A, R732L)</p>	<p>EETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSDFELSDLE  TALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKK  NYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQN  KLTDLEILALLIAALSADLDRGVNNSYIQRSEHP  LAQLYCHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSI  EEYKTLKIIKQAILATDLALYIKRLGEFFELIRKN  QFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQ  RIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKN  KIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGC  RKNRQKWQALAEQQ</p>	563	564
<p>ER (a.k. 305-549 ДТ,  T371A, L384M, M421G,  N519S, G521R, Y537S)</p>	<p>SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSE  ASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLAL  HDQVHLLCAWMEILMIGLVWRSMEHPGKLLFA  PNLLDRNQGKCVGGVEIFDMLLATSSRFRMMN  LQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHI  HRVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQHQRLAQLL  ILSHIRHMSSKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEM  LDAHRL</p>	633	636
<p>ER (a.k. 305-549 ДТ,  L384M, N413D, M421G,  G521R, Y537S)</p>	<p>SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSE  ASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTL  HDQVHLLCAWMEILMIGLVWRSMEHPGKLLFA  PNLLDRDQGKCVGGVEIFDMLLATSSRFRMMN  LQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHI  HRVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQHQRLAQLL  ILSHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEM  LDAHRL</p>	648	649
<p>hDhFR (Q36E, Q103H,</p>	<p>MVGSNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRY</p>	6548	6549

Y122I)	FERMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPL KGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEH PELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFV TRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQ EEKGIKYKFEVYEKND		
hDHFR (a.k. 2-187 ДТ, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	145	146-148
hDHFR (a.k. 2-187 ДТ, K55R, N65K, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGRKTWFSIPEKKRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	6552	6553
CD40L (ID в UniProt: P29965)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	3820	3821
sCD40L (113-269 ДТ)	MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCS NREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSA KPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSH GTGFTSFGLLKL	3822	3823
CD40L (a.k. 14-261 ДТ)	ATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHR RLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLN CEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNN LVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASS	3824	3825

	QAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTS FGLLKL		
CD40L (a.k. 1-261 ДТ, (S110-G116) del)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY TMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAK PCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHG TGFTSFGLLKL	3826	3827
CD40L (H224G, G226F)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIGLFGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6598	6599
CD40L (H224G, G226H)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIGLHGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6600	6601
CD40L (Y172G, G226F)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIG AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLFGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6602	6603

CD40L (Y170G, H224G, G226W)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYGIY AQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIGLWGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6604	6605
CD40L (H125G, G227F)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENSFEMQKGDQNPQIAAGVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6606	6607
CD40L (S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G, K115S)	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET KKENGGSGGSGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL	6674	6675
CD19 scFv	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI TGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQL SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIV GSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVS S	4049	4055
Шарнирный и трансмембранный домен CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	4866	4868

Костимулирующий домен CD28; внутриклеточный домен 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	5103	5110
Внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQUALPPR	4990	4996
Сайт расщепления P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	1637	1638
Спейсер 7	-	-	6536
Спейсер 6	-	-	6537
IRES	-	-	6538
Цитоплазматический хвост CD8	NHRNRR	6608	6609

**[00192]** Таблица 8: Конструкции CD40L

Название конструкции (описание)	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO аминокислоты:	SEQ ID NO нуклеиновой кислоты:
OT-001661 (линкер MH; CD40L; стоп-кодон)	MHMIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALF AVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCE EIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVIS EASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSS AKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFG LLKL*	3828	3829
OT-001685 (Met; FKBP (M1del, F37V, L107P); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MH; CD40L; стоп-кодон)	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRD RNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPEGSMHMIETYNQTSRSAATG LPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYT	3830	3831

	TMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAP FIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP GASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-001662 (Met; линкер (SG); ecDHFR (M1del, R12Y, Y100I); гистидиновый остаток; CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*	3832	3833
OT-001666 (Met; ER (305- 549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); гистидин; CD40L; стоп- кодон)	MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLL TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHILLECAWMEIL MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRDQGKCVEGGVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD HIHRVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH MSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLHMIETYNQ TSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLD KIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFV KDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVL QWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCS NREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIH LGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*	3834	3835
OT-001667 (Met; ER (а.к. 305-549 ДТ, T371A, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S); гистидин; CD40L; стоп- кодон)	MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLL TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLALHDQVHILLECAWMEIL MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRNQGKCVEGGVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD HIHRVLDKITDTLIHLMKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH MSSKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLHMIETYNQ TSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLD KIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFV KDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVL QWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCS	3836	3837

	NREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-001672 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MN; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL*	3838	3839
OT-001686 (сигнальная последовательность IL-2; линкер (EF); FKBP (M1del, F37V, L107P); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MN; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSEFGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSRRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKEGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL*	3840	3841
OT-001673 (сигнальная последовательность IL-2; линкер (GSSG); ecDHFR (M1del, R12Y, Y100I); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MN; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSSGISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL*	3842	3843
OT-001674 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; hPDE5(а.к. 535-860 ДТ, H653A, R732L); гибкий линкер с высоким	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSEETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSFDFELSDLETALCTIRMFDTLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQNKLTDL EILALLIAALSADLDHRGVNNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSIEEYKTTLKIKQAILATDLALYIKRLGEFFELIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKNKIPSM	3844	3845

содержанием G/S; линкер МН; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	QVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGCRKNRQKWQALAE QQGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTT MSNNLVLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFI ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPG ASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*		
ОТ-001675 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, F736A); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер МН; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSEETRELQSLAAAVVPSAQLK ITDFSDFELSDLETALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWI LSVKKNYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQNKLT DLEILALLIAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMEH HHFDQCLMILNSPGNQILSGLSIEEYKTTLKIIKQAILATDLALYI KRLGEFAELIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPW PIQQRIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKNKIPSM QVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGCRKNRQKWQALAE QQGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTT MSNNLVLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFI ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPG ASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	3846	3847
ОТ-001676 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер МН; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSEETRELQSLAAAVVPSAQLK ITDFSDFELSDLETALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWI LSVKKNYRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFAALKAGKIQNKLT DLEILALLIAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMEH HHFDQCLMILNSPGNQILSGLSIEEYKTTLKIIKQAILATDLALYI KRLGEFFELIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPW PIQQRIAELVATEFFDQGDREKELNIEPTDLMNREKKNKIPSM QVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGCRKNRQKWQALAE QQGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTT MSNNLVLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFI ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPG ASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	3848	3849

<p>OT-001677 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; ER (305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MH; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)</p>	<p>MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSSLALSALTADQMVSALLDAEPP  ILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKR VPGF  VDLTLHDQVHLLLECAWMEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL  LDRDQGKCVEGGVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSII  LLNSGVYTFLSSTLK SLEEKDHIHR VLDKITDTLIHLMKAGLT  LQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSD  LLEMLDAHRLGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ  WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN  REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL  GGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	3850	3851
<p>OT-001684 (сигнальная последовательность IL-2; гибкий линкер с высоким содержанием G/S; ER (а.к. 305-549 ДТ, T371A, L384M, M421G, N519S, G521R, Y537S); гибкий линкер с высоким содержанием G/S; линкер MH; CD40L (а.к. 113-269 ДТ); стоп-кодон)</p>	<p>MYRMQLLSICIALSLALVTNSGSSLALSALTADQMVSALLDAEPP  ILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKR VPGF  VDLALHDQVHLLLECAWMEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL  LDRNQGKCVEGGVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSII  LLNSGVYTFLSSTLK SLEEKDHIHR VLDKITDTLIHLMKAGLT  LQQHQRLAQLLLILSHIRHMSSKRMEHLYSMKCKNVVPLSD  LLEMLDAHRLGSMHMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQ  WAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN  REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL  GGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	3852	3853
<p>OT-001669 (линкер (MH); CD40L (а.к. 14-261 ДТ); стоп-кодон)</p>	<p>MHATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIED  ERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIM  LNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAE  KGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREAS  SQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVF  ELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	3854	3855
<p>OT-001668 (линкер (MH); CD40L (а.к. 1-261 ДТ, (S110-G116) del); стоп-кодон)</p>	<p>MHMIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALF  AVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCE  EIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENDQNPQIAAHVISEASSKTTS  VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQ  SIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	3856	3857

<p>OT-001663 (Met; hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, H653A, R732L); МН линкер; CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MEETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSFSDFELSDLETALCTIR MFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRH AFNTAQCMFAALKAGKIQNKLTLEILALLIAALSADLDHRGV NNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMHHHFDQCLMILNSPGNQILSGL SIEEYKTTLKIKQAILATDLALYIKRLEFFELIRKNQFNLEDPH QKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDRE RKELNIEPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSE DCFPLLDGCRKNRQKWQALAEQQMHMIETYNQTSRPSAATG LPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY TMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAP FIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGGVFELQP GASVFNVTDPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	6402	6403
<p>OT-001664 (Met; hPDE5 (а.к. 535-860 ДТ, R732L, F736A); МН линкер; CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MEETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSFSDFELSDLETALCTIR MFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRH AFNTAQCMFAALKAGKIQNKLTLEILALLIAALSHDLDRGV NNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMHHHFDQCLMILNSPGNQILSGL SIEEYKTTLKIKQAILATDLALYIKRLEFFELIRKNQFNLEDP HQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDR ERKELNIEPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVS EDCFPLLDGCRKNRQKWQALAEQQMHMIETYNQTSRPSAAT GLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNL HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKE ETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGGVFELQ PGASVFNVTDPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	6404	6405
<p>OT-001892 (Met; hPDE5 AA 535-860 ДТ (R732L); линкер (GGSGGGSGGGSG); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MEETRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSFSDFELSDLETALCTIR MFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRH AFNTAQCMFAALKAGKIQNKLTLEILALLIAALSHDLDRGV NNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMHHHFDQCLMILNSPGNQILSGL SIEEYKTTLKIKQAILATDLALYIKRLEFFELIRKNQFNLEDPH QKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDRE RKELNIEPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSE</p>	6534	6535

	<p>DCFPLLDGCRKNRQKWQALAEQQGGSGGGSGGGSGMIETYN  QTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLL  DKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGF  VKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSV  LQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSI  HLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>		
<p>OT-001605 (лидерная  последовательность  CD8<math>\alpha</math>; scFv CD19;  шарнирный и  трансмембранный домен  CD8<math>\alpha</math>; костимулирующий  домен  CD28/внутриклеточный  домен 4-1BB;  внутриклеточный домен  CD3 дзета; линкер (GS);  сайт расщепления P2A;  линкер (GS); линкер  (MH); CD40L; стоп-  кодон)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIMTQTSSLSASLGDRVTISC  RASQDISKYLWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG  SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGG  GSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD  YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS  KSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS  VTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG  LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP  FMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ  GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE  GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTAT  KDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENPGPGSMHMI  ETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYL  HRRLLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ  FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSK  TTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ  VTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCG  QQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	6539	6540
<p>OT-001607 (полная  конструкция (лидерная  последовательность  CD8<math>\alpha</math>; scFv CD19;  шарнирный и  трансмембранный домен  CD8<math>\alpha</math>; костимулирующий  домен  CD28/внутриклеточный  домен 4-1BB;</p>	-	-	6541

внутриклеточный домен CD3 дзета; стоп-кодон; спейсер; IRES; Met; линкер (GS); His; CD40L; стоп-кодон)			
ОТ-001607 (кодируемый белок 1 (лидерная последовательность CD8 $\alpha$ ; CD19 scFv; шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ ; костимулирующий домен CD28/внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета))	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLASLGDRVITISC RASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGSGG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	6542	6543
ОТ-001607 (кодируемый белок 2 (CD40L; стоп- кодон))	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAV YLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSSLNCEEIK SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEAS SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLK L*	6544	6545
ОТ-001966 (Met; ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); линкер (GGSGGGSGGGSG); CD40L; стоп-кодон)	MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLL TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHILLECAWMEIL MIGLVWRSMHPGKLLFAPNLLDRDQGKCVGGVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD HIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH MSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLGGSGGGSG GGSGMIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSA LFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSSLN CEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHV ISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGL YYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHS	6546	6547

	SAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSF GLLKL*		
OT-001962 (hDHFR (Q36E, Q103H, Y122I); линкер (H); CD40L; стоп- кодон)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFERMTTTS SVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQ GAHFLSRSLDDALKLTEHPELANK VDMVWIVGGSSVIKEAMN HPGHLKLVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQ EEKGIKYKFEVYEKNDHMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMY LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEM QKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTL ENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSP GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6550	6551
OT-002078 (Met; линкер ((GGSG)3); CD40L (H224G, G226F); стоп- кодон)	MGGSGGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER ILLRAANTHSSAKPCGQQSIGLFGVFELQPGASVFNVTDP SQV SHGTGFTSFGLLKL*	6610	6611
OT-002079 (Met; линкер ((GGSG)3); CD40L (H224G, G226H); стоп- кодон)	MGGSGGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER ILLRAANTHSSAKPCGQQSIGLHGVFELQPGASVFNVTDP SQ VSHGTGFTSFGLLKL*	6612	6613
OT-002080 (Met; линкер ((GGSG)3); CD40L (Y172G, G226F); стоп- кодон)	MGGSGGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIGAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER ILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLFGVFELQPGASVFNVTDP SQV SHGTGFTSFGLLKL*	6614	6615

<p>OT-002082 (Met; линкер ((GGSG)3); CD40L (H125G, G227F); стоп-кодон)</p>	<p>MGGSGGGGGGGSGMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTV  FLITQMIGSALFAVYLHRRDLKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT  GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD  QNPQIAAGVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK  QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER  ILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGFVFELQPGASVFNVTDPSQV  SHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6618</p>	<p>6619</p>
<p>OT-001967 (Met; ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); линкер (GS); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTPRPFSEASMMGLL  TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHILLECAWMEIL  MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRDQGKCVEGGVEIFDMLL  ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD  HIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH  MSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLGSMIETYN  QTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRD  LKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGF  VKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSV  LQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSI  HLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6620</p>	<p>6621</p>
<p>OT-001965 (Met; ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); линкер (GSG); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTPRPFSEASMMGLL  TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHILLECAWMEIL  MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRDQGKCVEGGVEIFDMLL  ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD  HIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH  MSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLGSGMIETY  NQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRR  LDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEG  FVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTT  VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQ  SIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6622</p>	<p>6623</p>
<p>OT-001961 (Met; hDHFR (2-187 ДТ, Y122I); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MVGLSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTS  SVEGKQNLVIMGKKTWFSEIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQ  GAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDVMVWIVGGSSVIKEAMN  HPGHLKLVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSVQ</p>	<p>6624</p>	<p>6625</p>

	EKGIKYKFEVYEKNDHMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMY LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEM QKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTL ENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSP GRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFELQPGASVFNVT TDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-001963 (Met; hDHFR (2-187 ДТ, K55R,N65K,Y122I); линкер (H); CD40L; стоп- кодон)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTS SVEGKQNLVIMGRKTFWFSIPEKKRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNH PGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSVQVE EKGIKYKFEVYEKNDHMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYL LTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQR CNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQ KGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTL NGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPG RFRERILLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFELQPGASVFNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6626	6627
OT-001671 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, R12Y, Y100I ); линкер (H); CD40L (а.к. 1-261 ДТ, (S110-G116) del); стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTS RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI ASLCLKSPGRFRERILLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFELQPG ASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6628	6629
OT-002106 (Met; ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); цитоплазматический хвост CD8; линкер; (GS); CD40L; стоп-кодон)	MSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTPRPFSEASMMGLL TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLCAWMEIL MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRDQGKCVEGGVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD HIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRH MSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLNHRNRRGS MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAV	6630	6631

		YLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIK SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEAS SKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLK L*		
OT-002107 (Met; цитоплазматический хвост CD8); линкер; (GS); ER (а.к. 305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S); линкер (GGSG)3; CD40L; стоп- кодон)		MNHRNRRGSSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFS EASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLL ECAWMEILMIGLVWRSMHPGKLLFAPNLLDRDQGKCV GVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTF TLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQL LLILSHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRL GGSGGGSGGSGMIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVF LITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER ILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQ VSHGTGFTSFGLLKL*	6632	6633
OT-002021 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100A); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)		MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVD CGDVPEIMVIGGRVAEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTS RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6634	6635
OT-002022 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100C); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)		MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVD CGDVPEIMVIGGRVCEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTS RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI	6636	6637

	MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002023 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100D); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVDEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6638	6639
OT-002024 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100E); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVEEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6640	6641
OT-002025 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100F); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVFEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6642	6643

<p>OT-002026 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100G); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVGEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6644</p>	<p>6645</p>
<p>OT-002027 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100H); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVHEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6646</p>	<p>6647</p>
<p>OT-002028 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100I); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6648</p>	<p>6649</p>
<p>OT-002029 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100K); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVKEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE</p>	<p>6650</p>	<p>6651</p>

	DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002030 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100L); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVLEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6652	6653
OT-002031 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100M); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVMEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6654	6655
OT-002032 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100N); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVNEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6656	6657

<p>OT-002033 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100P); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVPEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6658</p>	<p>6659</p>
<p>OT-002034 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100Q); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVQEFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6660</p>	<p>6661</p>
<p>OT-002035 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100R); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVREQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6662</p>	<p>6663</p>
<p>OT-002036 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100S); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVSEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE</p>	<p>6664</p>	<p>6665</p>

	DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002037 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100T); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVTEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6666	6667
OT-002038 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100V); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVVEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6668	6669
OT-002039 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ, Y100W); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)	MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA CGDVPEIMVIGGGRVWEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQCSIHLGG VFELQPGASVFNVTDPSPVSHGTGFTSFGLLKL*	6670	6671

<p>OT-002040 (Met; линкер (SG); ecDHFR (а.к. 2-159 ДТ); линкер (H); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSGISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV  IMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIAA  CGDVPEIMVIGGGRVYEQLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD  YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRHMIETYNQTSP  RSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE  DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDI  MLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW  AEKGYTMSNNLVLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE  ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG  VFELQPGASVFNVTDPSSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	<p>6672</p>	<p>6673</p>
--	--	-------------	-------------

## В. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

**[00193]** Идеи настоящего изобретения дополнительно включают фармацевтические композиции, содержащие одну или несколько настраиваемых систем экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, модифицированные клетки или полезные нагрузки по настоящему изобретению, и необязательно по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или инертный ингредиент.

**[00194]** В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату одной или нескольких настраиваемых систем экспрессии белка, нуклеиновых кислот, полинуклеотидов, полезных нагрузок или компонентов, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно с другими химическими компонентами, такими как физиологически приемлемые носители и наполнители.

**[00195]** Термин «наполнитель» или «неактивный ингредиент» относится к инертному или неактивному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения соединения.

**[00196]** В некоторых вариантах осуществления композиции вводят людям, пациентам-людям или субъектам-людям. Для целей настоящего изобретения фраза «активный ингредиент» обычно относится к любому одному или нескольким компонентам настраиваемой системы экспрессии белка, которые должны быть доставлены, как описано в данном документе.

**[00197]** Хотя описания фармацевтических композиций, предложенные в данном документе, в основном направлены на фармацевтические композиции, которые являются подходящими для введения человеку, квалифицированному специалисту будет понятно, что такие композиции обычно являются подходящими для введения любому другому животному, например, отличным от человека животным, например, отличным от человека млекопитающим. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций, включают, но не ограничиваясь ими,

отличных от человека млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, куры и свиньи, домашних животных, таких как кошки, собаки, или животных для научных исследований, таких как мыши, крысы, кролики, собаки и отличные от человека приматы.

**[00198]** Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть приготовлена, упакована и/или продана оптом, в виде одноразовой стандартной дозы и/или в виде множества одноразовых стандартных доз. В контексте данного документа термин «стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей предварительно определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, и/или удобной фракции такой дозировки, такой как, например, половина или треть такой дозировки.

**[00199]** Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого наполнителя или инертного ингредиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением будут варьироваться в зависимости от индивидуальных особенностей, телосложения и/или состояния субъекта, которого лечат, и, кроме того, в зависимости от пути введения композиции. В качестве примера, композиция может содержать от 0,1 % до 100 %, например, от 0,5 до 50 %, от 1 до 30 %, от 5 до 80 %, по меньшей мере 80 % (масс./масс.) активного ингредиента.

**[00200]** Эффективность лечения или облегчения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания лечебного эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое подлежит лечению или на которое направлена профилактика. Практикующий врач в данной области может контролировать эффективность лечения или профилактики, измеряя любой из таких параметров или любую комбинацию параметров. В связи с введением композиций по настоящему изобретению термин «эффективный против», например, рака, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит к положительному эффекту, по меньшей мере для статистически значимой части пациентов, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению нагрузки заболевания, уменьшению массы опухоли или количества клеток, продлению жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, обычно признаваемому как положительный врачами, знакомыми с лечением конкретного типа рака.

**[00201]** Лечебный или профилактический эффект очевиден, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров состояния болезни, или когда не наблюдается ухудшения или развития симптомов, которые в противном случае можно было бы ожидать. Например, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% измеряемого параметра заболевания, и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или больше, может

указывать на эффективное лечение. Эффективность данной композиции или состава по настоящему изобретению также можно оценить с помощью экспериментальной модели на животных для данного заболевания, как известно из уровня техники. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения подтверждается, когда наблюдается статистически значимое изменение.

### 1. Составы

**[00202]** Композиции, например полипептиды, белки, полинуклеотиды и векторные композиции по настоящему изобретению, могут быть составлены любым способом, подходящим для доставки. Композиция может включать, но не ограничиваясь ими, наночастицы, микросферы сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), липидоиды, липоплексы, липосомы, полимеры, углеводы (включая простые сахара), катионные липиды и их комбинации.

**[00203]** В одном варианте осуществления полинуклеотидный и векторный состав представляет собой наночастицу, которая может содержать по меньшей мере один липид. Липид может быть выбран, но не ограничиваясь ими, из DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG и ПЭГилированных липидов. В другом аспекте липид может представлять собой катионный липид, такой как, но не ограничиваясь ими, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA и DODMA.

**[00204]** Для полинуклеотидов по настоящему изобретению состав может быть выбран из любого из указанных, например, в международной заявке PCT/US2012/069610.

### 2. Неактивные ингредиенты

**[00205]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические или другие составы могут содержать по меньшей мере один наполнитель, который представляет собой неактивный ингредиент. В контексте данного документа термин «неактивный ингредиент» относится к одному или нескольким неактивным средствам, включенным в составы. В некоторых вариантах осуществления все, ни один или некоторые из неактивных ингредиентов, которые могут использоваться в составах по настоящему изобретению, могут быть одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Подходящие неактивные ингредиенты для составов по настоящему изобретению можно найти в международных публикациях заявителя №№ WO2018/161000; WO2018/231759; WO2019/241315; и WO2018/237323.

### 3. Дозировка, доставка и введение

**[00206]** Композиции по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку или субъекту одним или несколькими путями и способами. Вирусные векторы, содержащие одну или несколько настраиваемых систем экспрессии белков, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, полезные нагрузки и другие компоненты, описанные в данном документе, могут быть использованы для их доставки в клетку и/или субъекту. Также можно использовать другие способы, такие как mRNA, плазмиды и рекомбинантные белки.

#### 4. «Голая» доставка

**[00207]** Фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы в «голой» форме. В контексте данного документа термин «голый» относится к фармацевтическим композициям, настраиваемым системам экспрессии белка, нуклеиновым кислотам, полинуклеотидам или полезным нагрузкам, доставляемым без средств или модификаций, которые способствуют трансфекции или проницаемости. «Голые» фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды или полезные нагрузки могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы с использованием способов введения, известных их уровня техники и описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления «голая» доставка может включать состав в простом буфере, таком как физиологический раствор или PBS.

#### 5. Доставка в виде состава

**[00208]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть составлены с использованием способов, описанных в данном документе. Составы могут содержать фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды или полезные нагрузки, которые могут быть модифицированными и/или немодифицированными. Составы могут дополнительно включать, но не ограничиваясь ими, средства для проникновения в клетки, фармацевтически приемлемые носители, средства доставки, биоразлагаемые или биосовместимые полимеры, растворители и/или депо для доставки с замедленным высвобождением. Составы по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки с использованием способов введения, известных из уровня техники и описанных в данном документе.

**[00209]** Фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды или полезные нагрузки также могут быть составлены для прямой доставки в органы или ткани любым из нескольких способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, прямое замачивание или погружение посредством катетера, с помощью гелей, порошков, мазей, кремов, лосьонов и/или капель, с использованием таких субстратов, как ткань или биоразлагаемые материалы, покрытые или пропитанные композициями, и т.п.

#### 6. Доставка в клетки

**[00210]** В другом аспекте настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие настраиваемую систему экспрессии белка, DRD или полезную нагрузку, представляющую интерес, и композиции по настоящему изобретению и векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, могут быть введены в клетки, такие как иммунные эффекторные клетки.

**[00211]** В одном аспекте настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие настраиваемую систему экспрессии белка, DRD или полезную нагрузку, представляющую интерес, и композиции по настоящему изобретению, могут быть упакованы в плазмиды, вирусные векторы или интегрированы в вирусные геномы, обеспечивая временную или стабильную экспрессию полинуклеотидов. Предпочтительными вирусными векторами являются ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы и гамма-ретровирусные векторы. Для конструирования ретровирусного вектора молекула полинуклеотида, кодирующая настраиваемую систему экспрессии белка, DRD или полезную нагрузку, представляющую интерес, вставляется в вирусный ген вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, дефектного по репликации. Затем рекомбинантный вирусный вектор вводят в паковую клеточную линию, содержащую гены gag, pol и env, но без LTR и компонентов упаковки. Рекомбинантные ретровирусные частицы секретируются в культуральную среду, затем собираются, необязательно концентрируются и используются для переноса генов. Лентивирусные векторы особенно предпочтительны, поскольку они способны инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки.

**[00212]** Векторы также могут переноситься в клетки с помощью невирусных способов с использованием физических методов, таких как иглы, электропорация, сонопорация, гидропорация; химические носители, такие как неорганические частицы (например, фосфат кальция, диоксид кремния, золото), и/или химических методов. В некоторых вариантах осуществления для доставки могут использоваться синтетические или природные биоразлагаемые средства, такие как катионные липиды, липидные наноэмульсии, наночастицы, векторы на основе пептидов или векторы на основе полимеров. В некоторых вариантах осуществления векторы могут быть перенесены в клетки посредством временного разрушения мембраны, например, посредством высокоскоростной деформации клетки.

**[00213]** В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению могут быть непосредственно доставлены в клетку. В одном варианте осуществления полипептиды по настоящему изобретению могут быть доставлены с использованием синтетических пептидов, содержащих домен эндосомальной утечки (ELD), слитый с доменом проникновения в клетку (CLD). Полипептиды по настоящему изобретению вводятся в клетку совместно с синтетическим пептидом ELD-CLD. ELD облегчают выход белков, захваченных эндосомами, в цитозоль. Такие домены являются производными белков микробного и вирусного происхождения и описаны в данной области техники. CPD позволяют транспортировать белки через цитоплазматическую мембрану и также были описаны в данной области техники. Слитые белки ELD-CLD синергетически повышают эффективность трансдукции по сравнению с совместной трансдукцией с любым доменом в отдельности. В некоторых вариантах осуществления домен с высоким содержанием гистидина может быть необязательно добавлен к челночной конструкции в качестве дополнительного способа,

позволяющего ускользнуть из эндосомы в цитозоль. Челнок может также содержать остаток цистеина на N- или C-конце для образования мультимеров слитого пептида. Мультимеры слитых пептидов ELD-CLD, полученные путем добавления остатка цистеина к концу пептида, демонстрируют даже более высокую эффективность трансдукции по сравнению с конструкциями с одним слитым пептидом. Полипептиды по настоящему изобретению также могут быть добавлены к соответствующим сигнальным последовательностям локализации для направления груза в соответствующее субклеточное местоположение, например, ядро. В некоторых вариантах осуществления любой из ELD, CLD или слитых синтетических пептидов ELD-CLD, описанных в международной публикации патента WO2016161516 и WO2017175072, может быть использован в настоящем изобретении (содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

#### 7. Способы доставки и/или векторы

**[00214]** Настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или полезные нагрузки, представляющие интерес, по настоящему изобретению, могут быть доставлены с использованием одного или нескольких способов. В настоящем изобретении также предложены векторы, которые упаковывают полинуклеотиды по настоящему изобретению, кодирующие настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или конструкции полезной нагрузки, и их комбинации. Векторы по настоящему изобретению также можно использовать для доставки упакованных полинуклеотидов в клетку, локальный участок ткани или субъекту. Эти векторы могут быть любого типа, включая ДНК-векторы, РНК-векторы, плазмиды, вирусные векторы и частицы. Технология вирусных векторов хорошо известна и описана в Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Вирусы, которые используются в качестве векторов, включают, но не ограничиваясь ими, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), альфавирус, флавивирус, вирус герпеса, вирус кори, рабдовирус, ретровирус, лентивирус, вирус болезни Ньюкасла (NDV), поксвирус и пикорнавирус. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран из лентивирусного вектора, гамма-ретровирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусного вектора и вектора на основе вируса герпеса.

**[00215]** Как правило, векторы содержат точку начала репликации, функциональную по крайней мере в одном организме, промоторную последовательность, удобный сайт рестрикционной эндонуклеазы и один или несколько селективируемых маркеров, например, ген устойчивости к лекарственным средствам.

**[00216]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа клетки-хозяина, в которую должен быть введен вектор.

**[00217]** В некоторых вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может

содержать одну или несколько полезных нагрузок, описанных в данном документе, при этом две или более полезных нагрузок могут быть включены в один ответ лиганда. В этом случае две или более полезных нагрузок настраиваются одним и тем же лигандом или чувствительным средством одновременно.

#### 8. Лентивирусные носители/частицы

**[00218]** В некоторых вариантах осуществления лентивирусные носители/частицы могут использоваться в качестве средств доставки. Лентивирусы представляют собой подгруппу вирусов семейства *Retroviridae*, названной так потому, что перед интеграцией в геном хозяина требуется обратная транскрипция геномов вирусной РНК в ДНК. Таким образом, наиболее важными характеристиками лентивирусных носителей/частиц являются интеграция их генетического материала в геном целевой клетки/клетки-хозяина. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: HIV-1 и HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус болезни Джембрана (JDV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус болезни меди-висна и вирус козьего артрита-энцефалита (CAEV).

**[00219]** Обычно лентивирусные частицы, составляющие носитель для доставки гена, сами по себе дефектны по репликации (также обозначаемые «самоинактивирующимися»). Лентивирусы способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки благодаря механизму проникновения через интактную ядерную оболочку хозяина. Рекомбинантные лентивирусные носители/частицы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности HIV, например, гены *Env*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef* и *Tat* делетированы, что делает вектор биологически безопасным. Соответственно, лентивирусные носители, например, полученные из HIV-1/HIV-2, могут опосредовать эффективную доставку, интеграцию и долгосрочную экспрессию трансгенов в неделящиеся клетки. В контексте данного документа термин «рекомбинантный» относится к вектору или другой нуклеиновой кислоте, содержащей как лентивирусные последовательности, так и нелентивирусные ретровирусные последовательности.

**[00220]** Лентивирусные частицы могут быть получены путем совместной экспрессии элементов упаковки вируса и самого векторного генома в клетке-продуценте, такой как клетки человека HEK293T. Эти элементы обычно представлены в трех или четырех отдельных плазмидах. Клетки-продуценты котрансфицируются плазмидами, которые кодируют лентивирусные компоненты, включая коровые (т.е. структурные белки) и ферментативные компоненты вируса, оболочечный (оболочечные) белок (белки) оболочки (обозначаемый (обозначаемые) системами упаковки) и плазмиду, которая кодирует геном, содержащий чужеродный трансген, который должен быть перенесен в целевую клетку, сам носитель (также обозначаемый вектором переноса). Как правило, плазмиды или векторы включают в линию клеток-продуцентов. Плазмиды/векторы вводят посредством трансфекции, трансдукции или инфицирования в линию клеток-продуцентов.

Способы трансфекции, трансдукции или инфицирования хорошо известны специалистам в данной области техники. В качестве неограничивающего примера, конструкции для упаковки и переноса могут быть введены в линии клеток-продуцентов с помощью трансфекции фосфатом кальция, липофекции или электропорации, как правило, вместе с доминантным селективируемым маркером, таким как neo, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующим отбором при наличии соответствующего лекарственного средства и выделением клонов.

**[00221]** Клетка-продуцент продуцирует рекомбинантные вирусные частицы, которые содержат чужеродный ген, например, настраиваемую систему экспрессии белка, DRD и полезную нагрузку по настоящему изобретению. Рекомбинантные вирусные частицы выделяют из культуральной среды и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области техники. Рекомбинантные лентивирусные носители можно использовать для инфицирования целевых клеток.

**[00222]** Клетки, которые можно использовать для получения лентивирусных частиц с высоким титром, могут включать, но не ограничиваясь ими, клетки HEK293T, клетки 293G, клетки STAR (Relander et al., Mol. Ther., 2005, 11: 452-459), систему экспрессии FreeStyle™ 293 (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс) и другие линии клеток-продуцентов на основе HEK293T (например, Stewart et al., Hum Gene Ther. 2011, 22(3):357-369; Lee et al., Biotechnol Bioeng, 2012, 10996): 1551-1560; Throm et al., Blood. 2009, 113(21): 5104-5110; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

**[00223]** В некоторых аспектах оболочечные белки могут представлять собой гетерологичные оболочечные белки из других вирусов, такие как белок G вируса везикулярного стоматита (VSV G) или оболочечные белки бакуловирусов gp64. Гликопротеин VSV-G может быть особенно выбран среди видов, классифицированных в роде везикуловирусов: вируса Карахаса (CJSV), вируса Чандипура (CHPV), вируса Кокал (COCV), вируса Исфахана (ISFV), вируса Мараба (MARAV), вируса Ригу (PIRYV), вируса везикулярного стоматита Алагоаса (VSAV), вируса везикулярного стоматита Индианы (VSIV) ) и вируса везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV), и/или красителей, предварительно отнесенных к роду везикуловирусов в виде рабдовируса белого амура, вируса BeAn 157575 (BeAn 157575), вируса Ботеке (BTKV), вируса Кальчаки (CQIV), вируса американского угря (EVA), вируса Gray Lodge (GLOV), вируса Jurona (JURY), вируса Klamath (KLAV), вируса Kwatta (KWAV), вируса La Joya (LJV), вируса Malpais Spring (MSPV), вируса летучих мышей Mount Elgon (MEBV), вируса Perinet (PERV), рабдовируса щуки (PFRV), вируса Портона (PORV), вируса Radi (RADIV), вируса весенней виремии карпа (SVCV), вируса тупайя (TUPV), рабдовируса язвенной болезни (UDRV) и вируса Yug Bogdanovac (YBV). gp64 или другой бакуловирусный белок env может быть получен из вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV), вируса ядерного полиэдроза *Anagrapha falcifera*, вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori*, вируса ядерного полиэдроза *Choristoneura fumiferana*, вируса одиночно-капсидного

ядерного полиэдроса *Orgyia pseudotsugata*, вируса ядерного полиэдроса *Epiiphyas postvittana*, вируса ядерного полиэдроса *Huphantria cunea*, вирус ядерного полиэдроса *Galleria mellonella*, вируса Дори, вируса Тогото, вируса ядерного полиэдроса *Antheraea pernyi* или вируса Баткена.

**[00224]** Другие элементы, содержащиеся в лентивирусных частицах, могут содержать ретровирусный LTR (длинно-концевой повтор) на 5'- или 3'-конце, ретровирусный экспортный элемент, необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE), промотор или его активную часть и область контроля локуса (LCR) или ее активную часть.

**[00225]** Способы получения рекомбинантных лентивирусных частиц обсуждаются в данной области техники, например, в патентах США №№: 8846385; 7745179; 7629153; 7575924; 7179903; и 6808905.

**[00226]** Используемые лентивирусные векторы могут быть выбраны, но не ограничиваясь ими, из pLVX, pLenti, pLenti6, pLJM1, FUGW, pWPXL, pWPI, pLenti CMV puro DEST, pLJM1-EGFP, pULTRA, pInducer20, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL и pLionII.

#### 9. Аденоассоциированные вирусные частицы

**[00227]** Доставка полинуклеотидов любой из регулируемых белковых экспрессионных систем, DRD или полезных конструкций по настоящему изобретению может быть достигнута с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусных (rAAV) векторов. Такие векторы или вирусные частицы могут быть сконструированы для использования любого из известных серотипических капсидов или комбинаций серотипических капсидов.

**[00228]** Векторы AAV включают не только одноцепочечные векторы, но и самокомплементарные векторы AAV (scAAV). Векторы scAAV содержат ДНК, которая отжигается вместе с образованием двухцепочечного векторного генома. Путем пропуска синтеза второй цепи, scAAV обеспечивают быструю экспрессию в клетке.

**[00229]** Векторы rAAV могут быть получены стандартными способами, известными в данной области техники, такими как тройная трансфекция, в клетках насекомых sf9 или в суспензионных культурах клеток человека, таких как клетки HEK293.

**[00230]** Настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или полезные конструкции могут кодироваться в одном или нескольких вирусных геномах, которые должны быть упакованы в капсиды AAV, описанные в данном документе.

**[00231]** Такие векторные или вирусные геномы могут также включать, в дополнение к по меньшей мере одному или двум ITR (инвертированным концевым повторам), определенные регуляторные элементы, необходимые для экспрессии из вектора или вирусного генома. Такие регуляторные элементы хорошо известны из уровня техники и включают, например, промоторы, интроны, спейсеры, спейсерные последовательности и т.п.

**[00232]** Настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или полезные конструкции по

настоящему описанию можно вводить в одной или нескольких или отдельных частицах AAV.

**[00233]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка можно вводить в одной или нескольких частицах AAV. В некоторых вариантах осуществления более одной настраиваемой системы экспрессии белка, DRD или полезной нагрузки могут кодироваться в вирусном геноме.

10. Ретровирусные носители/частицы ( $\gamma$ -ретровирусные векторы)

**[00234]** В некоторых вариантах осуществления ретровирусные носители/частицы могут использоваться для доставки настраиваемых систем экспрессии белка, DRD или конструкций полезной нагрузки по настоящему изобретению. Ретровирусные векторы (RV) обеспечивают постоянную интеграцию трансгена в целевые клетки. Помимо лентивирусных векторов на основе комплекса HIV-1/2, ретровирусные векторы на основе простых гамма-ретровирусов широко используются для доставки терапевтических генов и клинически продемонстрированы как одна из наиболее эффективных и мощных систем доставки генов, способных к трансдукции широкого спектра типов клеток. Примеры видов гамма-ретровирусов включают вирусы лейкоза мышей (MLV) и вирусы лейкоза кошек (FeLV).

**[00235]** В некоторых вариантах осуществления гамма-ретровирусные векторы, полученные из гамма-ретровируса млекопитающих, такого как вирусы лейкоза мышей (MLV), являются рекомбинантными. Семейства гамма-ретровирусов MLV включают экотропные, амфотропные, ксенотропные и политропные подсемейства. Экотропные вирусы способны инфицировать только клетки мышей с помощью рецептора mCAT-1. Примерами экотропных вирусов являются MLV Молони и AKV. Амфотропные вирусы инфицируют мышей, людей и другие виды посредством рецептора Pit-2. Одним из примеров амфотропного вируса является вирус 4070A. Ксенотропные и политропные вирусы используют один и тот же рецептор (Xpr1), но различаются своим видовым тропизмом. Ксенотропные вирусы, такие как NZB-9-1, инфицируют людей и другие виды, но не вид мышей, тогда как политропные вирусы, такие как фокусобразующие вирусы (MCF), инфицируют мышей, людей и другие виды.

**[00236]** Гамма-ретровирусные векторы могут быть получены в пакующих клетках путем котрансфекции клеток несколькими плазмидами, включая кодирующую ретровирусный структурный и ферментативный (gag-pol) полипротеин, кодирующую оболочечный белок (env) и кодирующую mRNA вектора, содержащую полинуклеотид, кодирующий композиции по настоящему изобретению, который должен быть упакован во вновь образованные вирусные частицы.

**[00237]** В некоторых аспектах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы псевдотипированы оболочечными белками из других вирусов. Оболочечные гликопротеины включены во внешний липидный слой вирусных частиц, что может увеличивать/изменять тропизм клеток.

**[00238]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы представляют собой самоинактивирующиеся (SIN) гаммаретровирусные векторы. Векторы неспособны к репликации. Векторы SIN могут нести делецию в области 3' U3, изначально включающую энхансерную/промоторную активность. Кроме того, 5' U3-область может быть заменена сильными промоторами (необходимыми в линии пакующих клеток), полученными из цитомегаловируса или RSV, или выбранным внутренним промотором и/или энхансерным элементом. Выбор внутренних промоторов может быть сделан в соответствии с конкретными требованиями к экспрессии генов, необходимыми для конкретной цели настоящего изобретения.

**[00239]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или полезные конструкции, вставлены в рекомбинантный вирусный геном. Другие компоненты вирусной mRNA рекомбинантного гамма-ретровирусного вектора могут быть модифицированы путем вставки или удаления встречающихся в природе последовательностей (например, вставки IRES, вставки гетерологичного полинуклеотида, кодирующего полипептид, представляющий интерес, ющий или ингибирующую нуклеиновую кислоту, шаффлинга более эффективного промотора из другого ретровируса или вируса вместо промотора дикого типа и т.п.). В некоторых примерах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы могут содержать модифицированный сигнал упаковки и/или сайт связывания праймера (PBS), и/или 5'-энхансерные/промоторные элементы в U3-области 5'-длинного концевой повтора (LTR), и/или элементы 3'-SIN, модифицированные в U3-области 3'-LTR. Эти модификации могут повышать титры и возможность инфицирования.

#### 11. Онколитический вирусный вектор

**[00240]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть упакованы в онколитические вирусы. В контексте данного документа термин «онколитический вирус» относится к вирусу, который преимущественно инфицирует и уничтожает раковые клетки, такому как вакцинные вирусы. Онколитический вирус может встречаться в природе или может быть генетически модифицированным вирусом, таким как онколитический аденовирус и онколитический вирус герпеса.

**[00241]** В некоторых вариантах осуществления онколитической вакцинные вирусы могут включать вирусные частицы характеризующегося недостаточностью тимидинкиназы (ТК), экспрессирующего гранулоцитарно-макрофагальный (GM) колониестимулирующий фактор (CSF), репликационно-компетентного вектора на основе вируса осповакцины, достаточного для индукции онколиза клеток в опухоль; см., например, патент США №: 9226977.

#### 12. Информационная РНК (mRNA)

**[00242]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка, DRD или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть сконструированы в виде информационной РНК (mRNA). В контексте данного документа термин «информационная РНК»

(mRNA) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует полипептид, представляющий интерес, и который способен к трансляции с образованием кодируемого полипептида, представляющего интерес, *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Такие молекулы mRNA могут иметь структурные компоненты или особенности любых из тех, что описаны в международной заявке № PCT/US2013/030062.

**[00243]** В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули могут быть сконструированы в виде самоамплифицирующейся РНК. В контексте данного документа термин «самоамплифицирующаяся РНК» относится к молекулам РНК, которые могут реплицироваться в хозяине, что приводит к увеличению количества РНК и белка, кодируемого РНК. Такая самоамплифицирующаяся РНК может иметь структурные особенности или компоненты любых из тех, что описаны в публикации международной патентной заявки № WO2011005799.

### 13. Введение дозы

**[00244]** В настоящем изобретении предложены способы, включающие введение любого одного или нескольких компонентов или композиции настраиваемой системы экспрессии белка субъекту, нуждающемуся в этом. Их можно вводить субъекту с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для предупреждения или лечения или визуализации заболевания, нарушения и/или состояния (например, заболевания, нарушения и/или состояния, связанного с раком или аутоиммунным заболеванием). Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и тому подобного.

**[00245]** Композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно составляют в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций по настоящему изобретению может определяться лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий уровень дозы визуализации для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

**[00246]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно использовать для иммунотерапии рака в различных дозах для избежания истощения Т-клеток, предупреждения синдрома высвобождения цитокинов и сведения к минимуму токсичности, ассоциированной с иммунотерапией. Например, низкие дозы композиций по настоящему

изобретению можно использовать для первоначального лечения пациентов с высокой опухолевой нагрузкой, в то время как пациентов с низкой опухолевой нагрузкой можно лечить высокими и повторными дозами композиций по настоящему изобретению, чтобы гарантировать распознавание минимальной антигенной нагрузки опухоли. В другом случае композиции по настоящему изобретению могут доставляться пульсирующим образом для снижения тонической передачи сигналов с участием Т-клеток и повышения устойчивости *in vivo*. В некоторых аспектах токсичность может быть сведена к минимуму путем первоначального использования низких доз композиций по настоящему изобретению перед введением высоких доз. Введение дозы может быть изменено, если сывороточные маркеры, такие как ферритин, С-реактивный сывороточный белок, IL-6, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , повышены.

**[00247]** В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность может быть ассоциирована с терапией CAR или TIL. Такая нейротоксичность может быть ассоциирована с CAR CD19. Токсичность может быть связана с чрезмерной инфильтрацией Т-лимфоцитов в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность можно уменьшить путем предупреждения прохождения Т-клеток через гематоэнцефалический барьер. Это может быть достигнуто путем целевой делеции гена эндогенных ингибиторов интегрина альфа-4, таких как тисабри/натализумаб, которые также могут быть применимы в настоящем изобретении.

**[00248]** В данном документе также предложены способы введения лигандов или лигандов DRD в соответствии с настоящим изобретением субъекту, нуждающемуся в этом. Лиганд можно вводить субъекту или в клетки с помощью любого количества и любого пути введения, эффективного для настройки настраиваемой системы экспрессии белка, DRD или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и тому подобного. Субъект может представлять собой человека, млекопитающее или животного. Композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно составляют в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций по настоящему изобретению может определяться лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. В определенных вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в дозах, достаточных для доставки от приблизительно 0,0001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,005 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от

приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 50 мг/кг до приблизительно 500 мг/кг, от приблизительно 100 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела субъекта в день, один или несколько раз в день для получения необходимого эффекта. В некоторых вариантах осуществления уровни дозировки могут составлять 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 100 мг/кг, 110 мг/кг, 120 мг/кг, 130 мг/кг, 140 мг/кг, 150 мг/кг, 160 мг/кг, 170 мг/кг, 180 мг/кг или 190 мг/кг массы тела субъекта, один или несколько раз в день, для получения необходимого эффекта.

**[00249]** В настоящем изобретении предложены способы доставки в клетку или ткань любого из лигандов, описанных в данном документе, включающие приведение клетки или ткани в контакт с указанным лигандом, и которые могут осуществляться *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В определенных вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в клетки при уровнях дозы, достаточных для доставки от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 50 нМ, от приблизительно 10 нМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 50 нМ до приблизительно 500 нМ, от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1000 нМ, от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 10 мкМ, от приблизительно 5 мкМ до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 100 мкМ, от приблизительно 25 мкМ до приблизительно 250 мкМ или от приблизительно 50 мкМ до приблизительно 500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления лиганд можно вводить в клетки в дозах, выбранных из, но не ограничиваясь ими, 0,00064 мкМ, 0,0032 мкМ, 0,016 мкМ, 0,08 мкМ, 0,4 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 175 мкМ, 200 мкМ, 250 мкМ.

**[00250]** Необходимая доза лигандов по настоящему изобретению может быть доставлена только один раз, три раза в день, два раза в день, раз в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. В некоторых вариантах осуществления необходимая доза может быть доставлена с использованием нескольких способов введения (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати или более введений). При применении несколько введений могут использоваться схемы отдельного применения, такие как описанные в данном документе. В контексте данного документа термин «разделенная доза» представляет собой разделение единичной стандартной дозы или общей суточной дозы на две или более доз, например, два или более введений единичной стандартной дозы. В контексте данного документа термин «единичная стандартная доза» означает дозу любого терапевтического средства, вводимую в виде одной дозы/за один раз/за один прием/в единую точку контакта, т.е. за разовое введение. Необходимая доза лиганда по настоящему изобретению может вводиться в виде «импульсной дозы» или в виде «непрерывного потока». В контексте данного документа «импульсная доза»

представляет собой серию единичных стандартных доз любого терапевтического средства, вводимых с заданной частотой в течение определенного периода времени. В контексте данного документа «непрерывный поток» означает дозу терапевтического средства, вводимую непрерывно в течение определенного периода времени одним путем/в одной точке контакта, т.е. при непрерывном введении. Общая суточная доза, количество, введенное или прописанное в течение 24-часового периода, может быть введена любым из этих способов, или в виде комбинации этих способов, или любыми другими способами, подходящими для фармацевтического введения.

#### 14. Введение

**[00251]** В некоторых вариантах осуществления композиции для иммунотерапии рака или лечения аутоиммунного заболевания можно вводить в клетки *ex vivo*, а затем вводить субъекту. Иммунные клетки могут быть выделены и экспандированы *ex vivo* с использованием множества способов, известных из уровня техники. Например, способы выделения цитотоксических Т-клеток описаны в патентах США №№ 6805861 и 6531451. Выделение НК-клеток описано в патенте США № 7435596.

**[00252]** В некоторых вариантах осуществления в зависимости от природы клеток, клетки могут быть введены в организм-хозяин, например, млекопитающее, различными способами, включая инъекцию, переливание, инфузию, местную инстилляцию или имплантацию. В некоторых аспектах клетки по настоящему изобретению могут быть введены в место опухоли. Количество используемых клеток будет зависеть от ряда обстоятельств, цели введения, времени жизни клеток, используемого протокола, например, количества введений, способности клеток размножаться или т.п. Клетки могут находиться в физиологически приемлемой среде.

**[00253]** В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению можно вводить в нескольких дозах субъектам, имеющим заболевание или состояние. Введение обычно приводит к улучшению одного или нескольких симптомов рака или клинического состояния и/или лечению или предупреждению рака или клинического состояния или их симптома.

#### 15. Пути доставки

**[00254]** Фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, полезные нагрузки, векторы и клетки по настоящему изобретению можно вводить любым путем для достижения терапевтически эффективного результата. Они включают, но не ограничиваясь ими, энтеральный (в кишечник), гастроэнтеральный, эпидуральный (в твердую мозговую оболочку), пероральный (посредством ротовой полости), трансдермальный, перидуральный, интрацеребральный (в головной мозг), интрацеребровентрикулярный (в желудочки головного мозга), надкожный (нанесение на кожу), интрадермальный (в саму кожу), подкожный (под кожу), назальный (через нос), внутривенный (в вену), внутривенный болюс, внутривенную капельницу, внутриартериальный ( в артерию), внутримышечный (в мышцу), внутрисердечный (в сердце), внутрикостный (в костный мозг), интратекальный (в позвоночный канал),

интраперитонеальный (инфузия или инъекция в брюшину), внутрипузырную инфузию, интравитреальный (через глаз), интракавернозную инъекцию (в патологическую полость), внутриполостной (в основание полового члена), интравагинальное введение, внутриматочный, внеамниотический, трансдермальный (диффузия через интактную кожу для системного распределения), трансмукозальный (диффузия через слизистую оболочку), трансвагинальный, инсуффляцию (вдыхание), сублингвальный, сублабиальный, клизму, глазные капли (на конъюнктиву), в ушных каплях, ушной (в ухо или через ухо), буккальный (направленный к щеке), конъюнктивальный, кожный, зубной (к зубу или зубам), электроосмос, эндоцервикальный, эндосинуальный, эндотрахеальный, экстракорпоральный, гемодиализ, инфильтрацию, интерстициальный, внутрибрюшной, внутриамниотический, внутрисуставной, внутрибилиарный, внутрибронхиальный, интрабурсальный, внутривагинальный (в хрящ), интракаудальный (в конский хвост), интракестеральный (внутри дорсальная мозжечково-продолговатомозговой цистерны), интракорнеальный (внутри роговицы), зубной, интракорнеальный, интракоронарный (внутри коронарных артерий), интракорпоральный кавернозный (в расширяемые пространства кавернозного тела полового члена), интрадискальный (внутри диска), внутрипротоковый (внутри протока железы), интрадуоденальный (внутри двенадцатиперстной кишки), интрадуральный (внутри твердой мозговой оболочки или под ней), внутриэпидермальный (в эпидермис), внутрипищеводный (в пищевод), внутривентрикулярный (в желудок), внутридесневый (в пределах десны), интраилеальный (в дистальную часть тонкой кишки), внутрь очага поражения (внутри или непосредственно в локализованное поражение), внутрипросветный (в просвет трубки), внутрилимфатический (в пределах лимфы), интрамедуллярный (в костный мозг полости кости), интраменингеальный (внутри мозговых оболочек), интрамиокардиальный (внутри миокарда), внутриглазной (внутри глаза), внутривариальный (внутри яичника), внутривагинальный (внутри перикарда), внутривентрикулярный (в плевру), внутривагинальный (в пределах предстательной железы), внутривентрикулярный (в легкие или бронхи), интрасинальный (в носовые или периорбитальные пазухи), интраспинальный (в пределах позвоночного столба), интрасиновиальный (в синовиальную полость сустава), интратестискулярный (внутри сухожилия), интратестискулярный (внутри яичка), интратекальный (внутри спинномозговой жидкости на любом уровне спинномозговой оси), внутривентрикулярный (внутри грудной клетки), внутриканальцевый (внутри канальцев органа), внутривентрикулярный (внутри опухоли), интратимпанальный (в среднее ухо), внутрисосудистый (в сосуд или сосуды), внутривентрикулярный (в желудочек), ионтофорез (с помощью электрического тока, когда ионы растворимых солей мигрируют в ткани тела), спринцевание (для обмывания или промывания струей открытых ран или полостей тела), гортанный (непосредственно на гортань), назогастральный (через нос и в желудок), метод окклюзионной повязки (местное введение, которое затем покрывается повязкой, закрывающей область), офтальмологический (на внешнюю часть глаза), ротоглоточный (непосредственно в рот и глотку),

парентеральный, чрескожный, околосуставный, перидуральный, периневральный, пародонтальный, ректальный, респираторный (в дыхательные пути при пероральном или назальном вдыхании для местного или системного эффекта), ретробульбарный (за мостом или за глазным яблоком), интрамиокардиальный (вхождение в миокард), в мягкие ткани, субарахноидальный, субконъюнктивальный, подслизистый, местный, трансплацентарный (через плаценту или по ней), транстрахеальный (через стенку трахеи), транстимпанальный (по барабанной полости или через нее), мочеточниковый (к мочеточнику), уретральный (к уретре), вагинальный, каудальную блокаду, диагностический, нервную блокаду, перфузию желчевыводящих путей, перфузию сердца, фотоферез или спинномозговой.

#### 16. Парентеральное и инъекционное введение

**[00255]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, полезные нагрузки, векторы и клетки по настоящему изобретению можно вводить парентерально. Жидкие лекарственные формы для перорального и парентерального введения включают, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут включать адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, ароматизаторы и/отдушки. В некоторых вариантах осуществления для парентерального введения композиции смешивают с солюбилизующими агентами, такими как CREMOPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации. В других вариантах осуществления включены поверхностно-активные вещества, такие как гидроксипропилцеллюлоза.

**[00256]** Инъекционные формы, например, стерильные инъекционные водные или масляные суспензии, могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих средств, смачивающих средство и/или суспендирующих средств. Стерильные инъекционные формы могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксичных парентерально приемлемых разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, – вода, раствор Рингера, U.S.P.

(Фармакопея США), и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильные, нелетучие масла традиционно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут быть использованы при приготовлении инъекционных растворов.

**[00257]** Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

#### 17. Детектируемые средства и метки

**[00258]** Настраиваемые системы экспрессии белка, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, полезные нагрузки, векторы и клетки по настоящему изобретению могут быть ассоциированы или связаны с одним или несколькими радиоактивными средствами или детектируемыми средствами.

**[00259]** Эти средства включают различные органические малые молекулы, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или ферментные субстраты, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люциферазу, люциферин и экворин), хемилюминесцентные материалы, радиоактивные материалы (например,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  или  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (например, в качестве пертехнетата (технетат (VII),  $\text{TcO}_4^-$ )) и контрастные вещества (например, золото (например, наночастицы золота), гадолиний (например, хелатный Gd), оксиды железа (например, суперпарамагнитный оксид железа (SPIO), монокристаллические наночастицы оксида железа (MION) и сверхмалый суперпарамагнитный оксид железа (USPIO)), хелаты марганца (например, Mn-DPDP), сульфат бария, йодсодержащие контрастные вещества (йогексол), микропузырьки или перфторуглероды).

**[00260]** В некоторых вариантах осуществления детектируемое средство может представлять собой недетектируемый предшественник, который становится детектируемым при активации (например, флуорогенные конструкции тетразин-флуорофор (например, тетразин-BODIPY FL, тетразин-Oregon Green 488 или тетразин-BODIPY TMR-X), или активируемые ферментами флуорогенные средства (например, PROSENSE® (VisEn Medical))). Анализы *in vitro*, в которых можно использовать меченые ферментом композиции, включают, но не ограничиваясь ими, иммуноферментные анализы (ELISA), иммунопреципитационные анализы, иммунофлуоресценцию, иммуноферментные анализы (EIA), радиоиммуноанализы (RIA) и вестерн-блоттинг.

#### 18. Возможности и пути применения

**[00261]** Настраиваемые системы экспрессии белка, конструкции, лиганды или композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в большом количестве путей применения,

включая, помимо прочего, терапию, диагностику и прогнозирование, биоинженерию, биотехнологию, биопроизводство, исследовательские средства, метаболомику, экспрессию генов, замещение ферментов и т.д.

**[00262]** В настоящем изобретении предложены способы, включающие введение композиции, например, фармацевтической композиции, содержащей один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка, субъекту, нуждающемуся в этом.

**[00263]** Хотя может быть несколько путей использования, которые не включают медицинское лечение, например, для создания клеточных линий и реагентов для научных исследований, одно использование включает введение композиций по настоящему изобретению для осуществления генной терапии *in vivo* или получения модифицированных клеток для адоптивной клеточной терапии, например, лечения рака, аутоиммунных заболеваний и других заболеваний. В иллюстративный способ медицинского лечения или предупреждения заболевания, состояния или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, могут быть включены следующие стадии: (a) получение популяции клеток (человеческих, животных, первичных или клеточных культур, включая аутологичные, аллогенные или сингенные); (b) введение по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одну клетку в популяции клеток, при этом по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит: (i) первый полинуклеотид, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представляющий интерес, с помощью которого осуществляется лечение заболевания; вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), при этом последовательность нуклеиновой кислоты полезной нагрузки функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты DRD, которая кодирует белок, представляющий интерес, с помощью которого осуществляется лечение заболевания; (c) доставку клетки в организм субъекта; и (d) введение субъекту лиганда, который стабилизирует DRD в достаточной степени, чтобы обеспечить экспрессию белка, представляющего интерес, в клетке; при этом экспрессия белка, представляющего интерес, регулируется присутствием лиганда у субъекта, и количество и/или продолжительность введения лиганда достаточны для получения терапевтически эффективного количества белка, представляющего интерес, для лечения заболевания.

**[00264]** В указанном выше способе белок, представляющий интерес, можно использовать для облегчения, лечения, предупреждения или уменьшения одного или нескольких симптомов заболевания, состояния или нарушения.

**[00265]** Композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью любого количества и любого пути введения, эффективного для предупреждения или лечения или визуализации заболевания, нарушения и/или состояния (например, заболевания, нарушения и/или состояния, относящегося к недостаточности рабочей памяти). Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта,

серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и т.п.

**[00266]** Композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно составляют в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций по настоящему изобретению может определяться лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий уровень дозы визуализации для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

**[00267]** Также в данном документе предложены способы введения одного или нескольких стабилизирующих лигандов (в контексте данного документа лиганд, который стабилизирует DRD, может обозначаться стабилизирующим лигандом или просто лигандом, с пониманием того, что лиганд эффективен для стабилизации DRD, используемого в настраиваемых системах экспрессии белка в соответствии с настоящим изобретением) субъекту, нуждающемуся в этом. Лиганд можно вводить субъекту или в клетки с помощью любого количества и любого пути введения, эффективного для настройки количества белка, представляющего интерес, по настоящему изобретению в клетке, трансформированной настраиваемой системой экспрессии белка. Точное необходимое количество стабилизирующего лиганда будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и т.п. Субъект может представлять собой человека, млекопитающее или животного.

## C. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПУТИ ПРИМЕНЕНИЯ

### 1. Иммуноterapia рака

**[00268]** Иммуноterapia рака направлена на индукцию или восстановление реактивности иммунной системы по отношению к раку. Значительный прогресс в исследованиях иммунотерапии привел к разработке различных стратегий, которые в широком смысле можно разделить на активную иммуноterapia и пассивную иммуноterapia. В общем, эти стратегии можно использовать для прямого уничтожения раковых клеток или для противодействия иммуносупрессивному микроокружению опухоли. Активная иммуноterapia направлена на индукцию эндогенного длительного иммунного ответа, специфичного к опухолевым антигенам. Ответ может быть дополнительно усилен неспецифической стимуляцией модификаторов иммунного ответа, таких как цитокины. В отличие от этого, пассивная иммуноterapia включает

подходы, при которых хозяину вводят эффекторные иммунные молекулы, такие как специфичные к опухолевым антигенам цитотоксические Т-клетки или антитела. Этот подход недолговечен и требует нескольких возможностей применения.

**[00269]** Несмотря на значительные успехи, эффективность текущих стратегий иммунотерапии ограничена ассоциированными с ними видами токсичности. Они часто связаны с узким терапевтическим окном, связанным с иммунотерапией, что частично возникает вследствие необходимости доведения терапевтической дозы до предела потенциально летальной токсичности для получения клинически значимого лечебного эффекта. Кроме того, доза увеличивается *in vivo*, поскольку адоптивно перенесенные иммунные клетки продолжают пролиферировать в организме пациента, часто непредсказуемо.

**[00270]** Основным риском, связанным с иммунотерапией, являются целевые, но внеопухолевые побочные эффекты, возникающие в результате активации Т-клеток в ответ на нормальную тканевую экспрессию опухолеассоциированного антигена (ТАА). В клинических испытаниях с использованием Т-клеток, экспрессирующих Т-клеточный рецептор к специфическому ТАА, сообщали о кожной сыпи, колите и потере слуха в ответ на иммунотерапию.

**[00271]** Иммунотерапия также может вызывать целевые опухолевые виды токсичности, которые возникают, когда опухолевые клетки уничтожаются в ответ на иммунотерапию. Побочные эффекты включают синдром лизиса опухоли, синдром высвобождения цитокинов и связанный с ним синдром активации макрофагов. Важно отметить, что эти побочные эффекты могут возникать во время разрушения опухолей, и, таким образом, даже успешная опухолевая иммунотерапия может приводить к токсичности. Таким образом, подходы к контролю иммунотерапии посредством регулирования иммунотерапевтических средств весьма желательны, поскольку они могут снижать токсичность и сводить к максимуму эффективность.

**[00272]** В настоящем изобретении предложены системы, композиции, иммунотерапевтические средства и способы иммунотерапии рака. Эти композиции обеспечивают настраиваемую регуляцию экспрессии и функции генов в иммунотерапии. В одном аспекте системы, композиции, иммунотерапевтические средства и другие компоненты настоящего изобретения можно контролировать с помощью отдельно добавляемого стабилизирующего лиганда, который обеспечивает значительную гибкость для регулирования иммунотерапии рака. Кроме того, системы, композиции и способы по настоящему изобретению также можно комбинировать с терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства, малые молекулы, генная терапия и антитела.

**[00273]** Настраиваемая природа систем и композиций по настоящему изобретению способна улучшить эффективность и продолжительность эффективности иммунотерапевтических средств. Обратимый сайленсинг биологической активности адоптивно перенесенных клеток с использованием композиций по настоящему изобретению позволяет сводить к максимуму

потенциал клеточной терапии без безвозвратного уничтожения и прекращения терапии.

**[00274]** В настоящем изобретении предложены способы точной настройки иммунотерапии после введения пациентам. Это, в свою очередь, повышает безопасность и эффективность иммунотерапии и увеличивает популяцию субъектов, на которых может оказывать благоприятное воздействие иммунотерапия.

**[00275]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению могут представлять собой Т-клетки, НК-клетки, антигенпрезентирующие клетки, например, дендритную клетку или опухолевую клетку, инфильтрирующую опухоль, при этом иммунная клетка модифицирована для экспрессии CD40L в дополнение ко второй полезной нагрузке, например, антигенспецифическому Т-клеточному рецептору (TCR) или антигенспецифическому химерному антигенному рецептору (CAR), описанным в данном документе (известным как CAR Т-клетки). Соответственно, по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий как CD40L, так и систему CAR (или TCR), или первый полинуклеотид, кодирующий полезную нагрузку CD40L, функционально связанную с DRD, и второй полинуклеотид, кодирующий другую полезную нагрузку, например, антигенспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) или антигенспецифический химерный антигенный рецептор (CAR), описанные в данном документе, может быть связан с тем же или другим DRD, что и DRD, связанный с CD40L. В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению может содержать первый полинуклеотид, кодирующий CD40L, связанный с первым DRD, и второй полинуклеотид, кодирующий вторую полезную нагрузку, например, антигенспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), или антигенспецифический химерный антигенный рецептор (CAR), функционально связанный с первым DRD или, необязательно, со вторым, другим DRD. Вторая полезная нагрузка может быть не связана с DRD и может экспрессироваться в трансформированной или трансфицированной клетке. В различных вариантах осуществления первый и второй полинуклеотид могут присутствовать в одном векторе, или два полинуклеотида, каждый в отдельности, могут присутствовать в двух разных векторах. В некоторых вариантах осуществления, когда CD40L и вторая полезная нагрузка кодируются одним и тем же полинуклеотидом, вторая полезная нагрузка может быть функционально связана с DRD или может быть экспрессирована независимо от CD40L и не связана с каким-либо DRD, и может быть отделена от CD40L и/или DRD посредством IRES или некоторого другого сигнала терминации транскрипции таким образом, что трансляция и экспрессия второй полезной нагрузки не зависят от трансляции и экспрессии полезной нагрузки CD40L, функционально связанной с DRD. Затем один или несколько векторов могут быть введены в иммунную клетку, например, Т-клетку, НК-клетку, дендритную клетку или опухолевую клетку, инфильтрирующую опухоль.

**[00276]** В связанных вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, связывается со специфическим антигеном посредством внеклеточного нацеливающего фрагмента

CAR или TCR, таким образом, сигнал посредством внутриклеточного (внутриклеточных) сигнального (сигнальных) домена (доменов) передается в Т-клетку, и в результате Т-клетка активируется. Активированная CAR Т-клетка изменяет свое поведение, включая высвобождение цитотоксического цитокина (например, фактора некроза опухоли, лимфотоксина и т.д.), улучшение скорости пролиферации клеток, изменение молекулы на клеточной поверхности и т.п. Такие изменения вызывают разрушение целевой клетки, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR или TCR. Кроме того, высвобождение цитокина или изменение молекулы клеточной поверхности стимулирует другие иммунные клетки, например, В-клетку, дендритную клетку, NK-клетку и макрофаг.

**[00277]** В связанных иллюстративных вариантах осуществления CAR, введенный в Т-клетку, может представлять собой CAR первого поколения, содержащий только внутриклеточный сигнальный домен из TCR CD3 дзета, или CAR второго поколения, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из TCR CD3 дзета и костимулирующий сигнальный домен, или CAR третьего поколения, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из TCR CD3 дзета и два или более костимулирующих сигнальных домена, или систему расщепления CAR, или систему включения/выключения CAR. В одном примере экспрессия CD40L, CAR или TCR контролируется стабилизацией функционально связанного DRD, что в отсутствие стабилизирующего лиганда будет приводить к незначительному накоплению полезной нагрузки, т.е. CAR или TCR, или к ее отсутствию. В этих примерах две или более полезных нагрузок могут быть связаны с одним и тем же DRD или разными DRD, или одна из двух полезных нагрузок может не регулироваться DRD.

**[00278]** Полезная нагрузка, представляющая интерес, функционально связана с DRD, и поэтому без стабилизирующего лиганда практически не вырабатывается или не вырабатывается белок, представляющий интерес. Когда стабилизирующий лиганд вводится в клетку, трансформированную настраиваемой системой экспрессии белка, полезная нагрузка, связанная с DRD, стабилизируется, способствуя накоплению белка, представляющего интерес, в клетке. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления присутствие или отсутствие стабилизирующего лиганда DRD используется для настройки экспрессии CAR или TCR в трансдуцированных Т-клетках или NK-клетках. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка может быть необязательно связана с сигнальной последовательностью, лидерной последовательностью, сайтом расщепления или какой-либо другой пептидной или полипептидной последовательностью или последовательностями, которые позволяют отделять белок, представляющий интерес, от DRD в клетке после его накопления.

**[00279]** В некоторых вариантах осуществления CAR Т-клетки по настоящему изобретению могут быть дополнительно модифицированы для экспрессии еще одного, двух, трех или более иммунотерапевтических средств. Иммунотерапевтические средства могут представлять собой другой CAR или TCR, специфичный для другой целевой молекулы; цитокин, такой как IL2, IL12,

IL15 и IL18, или цитокиновый рецептор, такой как IL15Ra; рецептор химерного переключателя, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; хоминг-рецептор, который направляет адоптивно перенесенные клетки к целевому участку, такому как опухолевая ткань; средство, оптимизирующее метаболизм иммунной клетки; или ген переключателя безопасности (например, ген «самоубийства»), который уничтожает активированные Т-клетки, когда после переноса адоптивных клеток наблюдается серьезное событие или когда перенесенные иммунные клетки больше не требуются. Эти молекулы могут быть включены в один и тот же эффекторный модуль или в отдельные эффекторные модули.

**[00280]** В одном варианте осуществления CAR Т-клетка (включая TCR Т-клетку) по настоящему изобретению может представлять собой «вооруженную» CAR Т-клетку, которая трансформирована одним или несколькими компонентами настраиваемой системы экспрессии белка, содержащими полезную нагрузку CAR и либо одинаковую, либо разную полинуклеотидную последовательность, кодирующую CD40L, функционально связанную с одинаковыми или разными DRD. Индуцируемые или конститутивно секретируемые активные цитокины дополнительно «вооружают» CAR Т-клетки для повышения эффективности и устойчивости. В этом контексте такая CAR-Т-клетка также обозначается как «бронированная CAR-Т-клетка». Молекула «брони» может быть выбрана на основе микроокружения опухоли и других элементов врожденной и адаптивной иммунной систем. В некоторых вариантах осуществления молекула может представлять собой стимулирующий фактор, такой как IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN I типа, CD40L и 4-1BBL, которые, как было показано, дополнительно повышают эффективность и устойчивость CAR Т-клеток перед агрессивным опухолевым микроокружением посредством разных механизмов.

**[00281]** В одном варианте осуществления настраиваемая система экспрессии белка и ее компоненты, которые регулируют уровни экспрессии и активности любых описанных полезных нагрузок или белков, представляющих интерес (используемых взаимозаменяемо), могут применяться для иммунотерапии. В качестве неограничивающих примеров иммунотерапевтическое средство может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, специфический для рака Т-клеточный рецептор (TCR) и его варианты, противоопухолевый специфический химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор химерного переключателя, ингибитор коингибирующего рецептора или лиганда, агонист костимулирующего рецептора и лиганда, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, растворимый фактор роста, метаболический фактор, ген «самоубийства», хоминг-рецептор или любое средство, который индуцирует иммунный ответ в клетке и у субъекта.

**[00282]** В некоторых вариантах осуществления композиция для индукции или подавления иммунного ответа может содержать один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка или один или несколько полипептидов, кодируемых настраиваемой системой экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка

может содержать первый полинуклеотид, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полезную нагрузку; вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD).

**[00283]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка и композиции по настоящему изобретению связаны с функцией настраиваемой экспрессии белка (белка, представляющего интерес, или полезной нагрузки), включая, например, противоопухолевые иммунные ответы иммунотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтические средства могут включать цитокины, хемокины, антитела, интегрины, интегральные белки, мембранные белки, внеклеточные белки, например, CD40L, которые можно использовать для активации или улучшения функции одного или нескольких типов иммунных клеток, или подавляют активность одного или нескольких типов иммунных клеток. В различных вариантах осуществления иммунотерапевтические средства, применимые в лечении заболевания, состояния или нарушения, могут включать CD40L, в отдельности или в комбинации с другими цитокинами, хемокинами, антителами, интегринными, интегральными белками, мембранными белками, внеклеточными белками. В различных вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка обеспечивает белок, представляющий интерес, или полезную нагрузку, которая содержит CD40L, который способствует или регулирует продолжительность жизни и активность одного или нескольких типов иммунных клеток, применимых для лечения заболевания, состояния или нарушения или симптома, связанного с любым из них.

## 2. Адоптивный перенос клеток (адоптивная иммунотерапия)

**[00284]** В некоторых вариантах осуществления клетки, которые генетически модифицированы для кодирования и экспрессии по меньшей мере одной полезной нагрузки, например CD40L, функционально связанной с DRD, регулирующую экспрессию которого можно использовать для адоптивной клеточной терапии (АСТ). В контексте данного документа термин «адоптивный перенос клеток» относится к введению иммунных клеток (от аутологичных, аллогенных или генетически модифицированных хозяев) с прямой противораковой активностью. АСТ продемонстрировала перспективность в клиническом применении против злокачественных и инфекционных заболеваний.

**[00285]** В соответствии с настоящим изобретением один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка могут быть использованы при разработке и внедрении клеточных видов терапии, таких как адоптивная клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка могут применяться в клеточных видах терапии для воздействия на CAR-терапию, в манипуляции или регуляции ТП, в аллогенной клеточной терапии, в комбинированной Т-клеточной терапии с другими линиями лечения (например, облучением, цитокинами), для кодирования сконструированных TCR или модифицированных TCR, или для усиления Т-клеток, отличных от

TCR (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

**[00286]** В данном документе предложены способы применения в адоптивной клеточной терапии. Эти способы включают предварительную подготовку субъекта, нуждающегося в этом; модулирование иммунных клеток одним или несколькими компонентами настраиваемой системы экспрессии белка и/или композициями по настоящему изобретению; введение субъекту сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих композиции по настоящему изобретению, и успешное привитие сконструированных клеток в организм субъекта.

**[00287]** В некоторых вариантах осуществления регулируемые системы экспрессии белка и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для сведения к минимуму режимов прекондиционирования, ассоциированных с адоптивной клеточной терапией. В контексте данного документа термин «прекондиционирование» относится к любой терапевтической схеме, вводимой субъекту для улучшения результатов адоптивной клеточной терапии. Стратегии прекондиционирования включают, но не ограничиваясь ими, облучение всего тела и/или лимфодеплеционную химиотерапию. Клинические испытания адоптивной терапии без прекондиционирования не продемонстрировали какой-либо клинической пользы, что указывает на ее важность при АСТ. Тем не менее, прекондиционирование ассоциировано со значительной токсичностью и ограничивает когорту субъектов, который является подходящим для АСТ. В некоторых случаях иммунные клетки для АСТ могут быть сконструированы для экспрессии CD40 L в отдельности или с цитокином, таким как IL-2, IL-6, IL-12 и IL-15 в качестве полезной нагрузки, с использованием настраиваемых конструкций экспрессии белка, описанных в данном документе, для обеспечения селективной экспрессии белка, представляющего интерес, который может быть настроен с помощью стабилизирующего лиганда по настоящему изобретению для уменьшения необходимости в прекондиционировании.

**[00288]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут представлять собой дендритные клетки, Т-клетки, такие как CD8<sup>+</sup> Т-клетки и CD4<sup>+</sup> Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), NK-Т-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), клетки-киллеры, активированные лимфокином (LAK), Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg), Т-клетки-хелперы, клетки-киллеры, индуцированные цитокином (CIK), и любые их комбинации. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие клетки для АСТ могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток (ESC) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). В некоторых вариантах осуществления для АСТ применяются аутологичные или аллогенные иммунные клетки.

**[00289]** В некоторых вариантах осуществления клетки, применяемые для АСТ, могут представлять собой антигенпрезентирующие клетки, например, дендритные клетки и Т-клетки, сконструированные для экспрессии CD40L в отдельности или в комбинации с CAR, содержащими

антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену на опухолевых клетках, представляющих интерес. В других вариантах осуществления клетки, применяемые для АСТ, могут представлять собой NK-клетки, сконструированные для экспрессии CD40L в отдельности или в комбинации с цитокинами или CAR, которые можно применять для адоптивной иммунотерапии. В одном примере смесь дендритных клеток, Т-клеток и/или NK-клеток может применяться для АСТ. Уровень экспрессии CD40L в антигенпрезентирующих клетках, Т-клетках и/или NK-клетках в соответствии с настоящим изобретением регулируется и контролируется малой молекулой, которая связывается с DRD, функционально связанным (связанными) с полезной нагрузкой, например, CD40L, что обеспечивает селективную экспрессию CD40L в трансформированных антигенпрезентирующих клетках, Т-клетках и NK-клетках либо в отдельности, либо в сочетании с другими полезными нагрузками, например, CAR или цитокинами, например, IL-2, I-L6, IL-12 и IL-15 в виде полезной нагрузки.

**[00290]** В некоторых вариантах осуществления NK-клетки, сконструированные для экспрессии одного или нескольких компонентов настраиваемой системы экспрессии белка, можно применять для АСТ. Активация NK-клеток индуцирует перфорин/гранзим-зависимый апоптоз в целевых клетках. Активация NK-клеток также индуцирует секрецию цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и GM-CSF. Эти цитокины усиливают фагоцитарную функцию макрофагов и их антимикробную активность, а также усиливают адаптивный иммунный ответ за счет стимуляции презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки (DC).

**[00291]** Другие примеры генетической модификации могут включать введение химерных антигенных рецепторов (CAR) и подавление ингибирующих NK-клеточных рецепторов, таких как NKG2A.

**[00292]** NK-клетки также могут быть генетически перепрограммированы для обхода ингибирующих сигналов NK-клеток при взаимодействии с опухолевыми клетками. Например, использование CRISPR, ZFN или TALEN для генетической модификации NK-клеток для сайленсинга их ингибирующих рецепторов может повышать противоопухолевую способность NK-клеток.

**[00293]** Иммунные клетки могут быть выделены и экспандированы *ex vivo* с использованием множества способов, известных из уровня техники. Например, способы выделения и экспансии цитотоксических Т-клеток описаны в патентах США №№ 6805861 и 6531451; публикации патента США № US20160348072A1 и международной публикации патента № WO2016168595A1; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Выделение и экспансия NK-клеток описаны в публикации патента США № US20150152387A1, патенте США № 7435596; и Oyer, J.L. (2016). *Cytotherapy* 18(5):653-63; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В частности, первичные NK-клетки человека можно экспандировать в присутствии

питающих клеток, например, линии миелоидных клеток, которая была генетически модифицирована для экспрессии мембраносвязанных IL-15, IL-21, IL-12 и 4-1BBL.

**[00294]** В некоторых случаях субпопуляции иммунных клеток могут быть обогащены для АСТ. Способы обогащения иммунных клеток описаны в международной публикации патента № WO2015039100A1. В другом примере Т-клетки, положительные по маркеру В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), можно использовать для обогащения Т-лимфоцитами, которые обладают противораковой реактивностью, как описано в патенте США № 9512401 (содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

**[00295]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут быть деплетированы в выбранных субпопуляциях для увеличения Т-клеточной экспансии. Например, иммунные клетки могут быть деплетированы Foxp3<sup>+</sup> Т-лимфоцитами для сведения к минимуму противоопухолевого иммунного ответа с помощью способов, описанных в публикации патента США № US 20160298081A1; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[00296]** В некоторых вариантах осуществления активация и экспансия Т-клеток для АСТ достигается антигенной стимуляцией временно экспрессируемого химерного антигенного рецептора (CAR) на клеточной поверхности. Такие способы активации описаны в международном патенте № WO2017015427, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[00297]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут активироваться антигенами, ассоциированными с антигенпрезентирующими клетками (APC). В некоторых вариантах осуществления APC могут быть дендритными клетками, макрофагами или В-клетками, которые являются антигенспецифическими или неспецифическими. APC могут быть аутологичными или гомологичными в своем органе. В некоторых вариантах осуществления APC могут представлять собой искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC), такие как клеточные aAPC или бесклеточные aAPC. Клеточные aAPC могут быть выбраны либо из генетически модифицированных аллогенных клеток, таких как клетки при эритролейкозе человека, либо из ксеногенных клеток, таких как мышинные фибробласты и клетки дрозофилы. В качестве альтернативы APC могут быть бесклеточными, при этом антигены или костимулирующие домены презентуются на синтетических поверхностях, таких как латексные гранулы, полистирольные гранулы, липидные везикулы или экзосомы.

**[00298]** В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению, в частности, Т-клетки, могут быть экспандированы с использованием платформ искусственных клеток. В одном варианте осуществления зрелые Т-клетки могут быть получены с использованием искусственных органоидов тимуса (АТО), описанных Seet CS et al. 2017. Nat Methods 14, 521-530 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). АТО основаны на

линии стромальных клеток, экспрессирующих дельта-подобный канонический лиганд Notch (DLL1). В этом способе стромальные клетки агрегируются с гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками путем центрифугирования и размещаются на вставке с культурой клеток на границе раздела воздух-жидкость для образования культур органоидов. Т-клетки, полученные из АТО, обладают наивными фенотипами, разнообразным репертуаром Т-клеточных рецепторов (TCR) и TCR-зависимой функцией.

**[00299]** В некоторых вариантах осуществления адоптивная клеточная терапия осуществляется путем аутологичного переноса, при этом клетки получают от субъекта, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту. В других случаях АСТ может включать аллогенный перенос, при котором клетки выделяют и/или получают от субъекта-донора, отличного от субъекта-реципиента, который в конечном итоге получает клеточную терапию. Субъект-донор и субъект-реципиент могут быть генетически идентичными, похожими или могут экспрессировать один и тот же класс или подтип HLA.

**[00300]** В некоторых вариантах осуществления множественные иммунотерапевтические средства, введенные в иммунные клетки для АСТ (например, дендритные клетки, Т-клетки и НК-клетки), могут контролироваться одной и той же или разными настраиваемыми системами экспрессии белка. В одном примере каждая из двух полезных нагрузок, например, полезная нагрузка CD40L и конструкция CAR, такая как полезная нагрузка CAR CD19, регулируются одним или несколькими DRD в одной или разных настраиваемых системах экспрессии белка. В некоторых связанных вариантах осуществления полезные нагрузки связаны с одним и тем же или разными DRD. В некоторых вариантах осуществления CD40L функционально связан с DRD, и конструкция CAR, такая как CAR CD19, расположена выше или ниже от CD40L и не связана с каким-либо DRD, или конструкция CAR, такая как CAR CD19, вводится в клетку, кодируемая отдельной нуклеотидной последовательностью в качестве нуклеотидной последовательности, кодирующей первую полезную нагрузку, а вторая полезная нагрузка может быть связана с DRD, который является таким же или отличным от DRD, связанным с CD40L, или может не иметь какой-либо связи с любым DRD. Полезные нагрузки транскрибируются, транслируются и экспрессируются, когда DRD стабилизируется/стабилизируются стабилизирующим лигандом, специфичным в отношении DRD. Экспрессия CD40L и, возможно, второй полезной нагрузки, например, IL-12 и/или CAR CD19, может быть настроена с помощью одного или нескольких стабилизирующих лигандов. В других вариантах осуществления множественные иммунотерапевтические средства, введенные в иммунные клетки для АСТ (например, Т-клетки и НК-клетки), могут контролироваться различными настраиваемыми системами экспрессии белка. В одном примере, каждое из CD40L и конструкции CAR, такой как CAR CD19, может быть функционально связано с разными DRD и, таким образом, может быть настроено отдельно с использованием разных стимулов.

**[00301]** После генетической модуляции с использованием одного или нескольких компонентов

настраиваемой системы экспрессии белка и композиций по настоящему изобретению клетки вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут применяться в связи с предложенными способами и композициями.

**[00302]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут быть модифицированы для экспрессии одного или нескольких иммунотерапевтических средств (белков, представляющих интерес), которые способствуют активации, инфильтрации, экспансии, выживанию и противоопухолевым функциям иммунных клеток. Иммунотерапевтические средства могут представлять собой второй CAR или TCR, специфичный для другой целевой молекулы; цитокин или цитокиновый рецептор; рецептор химерного переключателя, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; хоминг-рецептор, который направляет адоптивно перенесенные клетки к целевому участку, такому как опухолевая ткань; средство, оптимизирующее метаболизм иммунной клетки; или ген переключателя безопасности (например, ген «самоубийства»), который уничтожает активированные Т-клетки, когда после переноса адоптивных клеток наблюдается серьезное событие или когда перенесенные иммунные клетки больше не требуются.

**[00303]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки, используемые для переноса адоптивных клеток, можно генетически модифицировать для улучшения их устойчивости, цитотоксичности, способности нацеливания на опухоли и способности к хомингу в очагах заболевания *in vivo*, с общей целью дальнейшего улучшения их способности уничтожать опухоли у больных раком. Одним из примеров является введение одного или нескольких компонентов настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению, кодирующей цитокин, такой как гамма-цитокин (например, IL-2 и IL-15), в иммунные клетки для стимулирования пролиферации и выживания иммунных клеток. Трансдукция генов цитокинов (например, гамма-цитокинов IL-2 и IL-15), кодируемых настраиваемой системой экспрессии белка, в иммунные клетки будет способствовать тому, чтобы иммунные клетки, например, NK-клетки, размножились без добавления экзогенных цитокинов, так что NK-клетки, экспрессирующие цитокины, обладают повышенной противоопухолевой цитотоксичностью.

**[00304]** В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка могут быть использованы для предупреждения истощения Т-клеток. В контексте данного документа термин «истощение Т-клеток» относится к постепенной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки обладают низкой способностью к пролиферации и продуцированию цитокинов, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией множественных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в

отсутствие антигена.

**[00305]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка и ее компоненты могут применяться для предупреждения истощения Т-клеток в контексте Т-клеточной терапии химерными антигенными рецепторами (CAR-T). В этом контексте истощение в некоторых случаях может быть вызвано олигомеризацией scFv CAR на клеточной поверхности, что приводит к непрерывной активации внутриклеточных доменов CAR. В качестве неограничивающего примера CAR по настоящему изобретению могут включать scFv, которые неспособны олигомеризоваться. В качестве другого неограничивающего примера, CAR, которые быстро интернализуются и повторно экспрессируются после воздействия антигена, также могут быть выбраны для предупреждения хронической олигомеризации scFv на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления каркасная область scFv может быть модифицирована для предупреждения конститутивной передачи сигналов с участием CAR (Long et al. 2014. *Cancer Research*. 74(19) S1; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме). Один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению также можно применять для регуляции поверхностной экспрессии CAR на поверхности Т-клеток для предупреждения хронической активации Т-клеток. CAR по настоящему изобретению также могут быть сконструированы таким образом, чтобы сводить к минимуму истощение. В качестве неограничивающего примера сигнальный домен 41-BB может быть включен в конструкцию CAR для уменьшения истощения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любая из стратегий, раскрытых Long HA et al., может применяться для предупреждения истощения (Long A H et al. (2015) *Nature Medicine* 21, 581–590; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

**[00306]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемая природа настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению может быть использована для обращения истощения Т-клеток человека, наблюдаемого при тонической передаче сигналов с участием CAR. Обратимый сайленсинг биологической активности адоптивно перенесенных клеток с помощью композиций по настоящему изобретению можно применять для обращения тонической передачи сигналов, которая, в свою очередь, может восстанавливать Т-клетки. Обратимость истощения можно измерить по подавлению множественных ингибирующих рецепторов, ассоциированных с истощением.

**[00307]** В некоторых вариантах осуществления метаболические пути Т-клеток могут быть модифицированы для снижения предрасположенность Т-клеток к истощению. Метаболические пути могут включать, но не ограничиваясь ими, гликолиз, цикл мочевины, цикл лимонной кислоты, бета-окисление, биосинтез жирных кислот, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов и метаболические пути гликогена. В качестве неограничивающего примера полезные нагрузки, которые снижают скорость гликолиза, могут использоваться для ограничения или предупреждения истощения Т-клеток (Long et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2013, 1(Suppl 1): P21; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте

осуществления Т-клетки по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с ингибиторами гликолиза, такими как 2-дезоксиглюкоза и рапамицин.

**[00308]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки или белки, представляющие интерес, по настоящему изобретению, могут применяться в сочетании с антителами или фрагментами, которые нацелены на маркеры поверхности Т-клеток, ассоциированные с истощением Т-клеток. Маркеры поверхности Т-клеток, ассоциированные с истощением Т-клеток, которые можно использовать, включают, но не ограничиваясь ими, CTLA-1, PD-1, TGIT, LAG-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA и CD96. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка могут быть использованы для предупреждения истощения Т-клеток. В контексте данного документа термин «истощение Т-клеток» относится к постепенной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки обладают низкой способностью к пролиферации и продуцированию цитокинов, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией множественных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в отсутствие антигена.

**[00309]** В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка и ее компоненты могут применяться для предупреждения истощения Т-клеток в контексте Т-клеточной терапии химерными антигенными рецепторами (CAR-T). В этом контексте истощение в некоторых случаях может быть вызвано олигомеризацией scFv CAR на поверхности клетки, что приводит к непрерывной активации внутриклеточных доменов CAR. В качестве неограничивающего примера CAR по настоящему изобретению могут включать scFv, которые неспособны олигомеризоваться. В качестве другого неограничивающего примера, CAR, которые быстро интернализуются и повторно экспрессируются после воздействия антигена, также могут быть выбраны для предупреждения хронической олигомеризации scFv на поверхности клетки. В одном варианте осуществления каркасная область scFv может быть модифицирована для предупреждения конститутивной передачи сигналов с участием CAR (Long et al. 2014. Cancer Research. 74(19) S1; содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме). Один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению также можно применять для регуляции поверхностной экспрессии CAR на поверхности Т-клеток для предупреждения хронической активации Т-клеток. CAR по настоящему изобретению также могут быть сконструированы таким образом, чтобы сводить к минимуму истощение. В качестве неограничивающего примера сигнальный домен 41-BB может быть включен в конструкцию CAR для уменьшения истощения Т-клеток.

**[00310]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно

применять для изменения популяций ТИЛ (лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль) у субъекта. В одном варианте осуществления любую из полезных нагрузок, описанных в данном документе, можно применять для изменения соотношения CD4 положительных клеток к CD8 положительным популяциям. В некоторых вариантах осуществления ТИЛ могут быть отсортированы *ex vivo* и сконструированы для экспрессии любого из цитокинов, описанных в данном документе. Полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для экспансии CD4 и/или CD8 популяций ТИЛ для усиления опосредованного ТИЛ иммунного ответа.

**[00311]** Параметры для улучшения результатов CAR-T терапии описаны в Finney et al. JCI. 2019; 129(5):2123-2132 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Уровни биомаркера LAG3 (высокий)/TNF- $\alpha$  (низкий) в CD8+ Т-клетках периферической крови во время афереза также могут прогнозировать последующий дисфункциональный ответ у субъектов с высокой антигенной нагрузкой, которые не достигают полного ответа, который сохраняется дольше нескольких недель. Внутренние свойства Т-клеток, которые являются следствием начального репертуара Т-клеток и сведения воедино эффектов производственного процесса с активацией, индуцированной антигеном CD19 после адоптивного переноса, также могут играть роль в результате CAR-T терапии. На начальный репертуар Т-клеток может частично влиять время проведения афереза. В одном варианте осуществления аферез можно проводить до химиотерапии. Кумулятивная нагрузка лейкозных и нормальных В-клеток, экспрессирующих CD19, по оценке в костном мозге до лимфодеплеционной химиотерапии, может иметь важное значение для определения результата CAR-T терапии. В соответствии с Finney et al., увеличение антигенной нагрузки улучшает результат CAR-T терапии. Для увеличения антигенной нагрузки CD19 *in vivo* субъектам также можно инфузировать экспандированные полученные от субъекта Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии CD19 (также обозначаемые Т-APC).

### 3. Противораковые вакцины

**[00312]** В некоторых вариантах осуществления конструкции настраиваемой системы экспрессии белка, полезные нагрузки, представляющие интерес (например, иммунотерапевтические средства), векторы, клетки и композиции по настоящему изобретению могут применяться в сочетании с противораковыми вакцинами.

**[00313]** В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина может содержать пептиды и/или белки, полученные из опухолеассоциированного антигена (ТАА). Такие стратегии можно применять для вызова иммунного ответа у субъекта, который в некоторых случаях может представлять собой ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Пептиды, используемые для противораковых вакцин, также можно модифицировать для соответствия мутационному профилю субъекта. Например, пептиды, полученные из EGFR, с мутациями, соответствующими мутациям, обнаруженным у субъекта, нуждающегося в терапии, успешно применялись у пациентов с раком легкого.

**[00314]** В одном варианте осуществления противораковые вакцины по настоящему изобретению могут содержать пептидные лиганды, измененные суперагонистами (APL), полученными из ТАА. Эти мутантные пептидные лиганды отклоняются от нативной пептидной последовательности на одну или несколько аминокислот, которые активируют специфические клоны CTL более эффективно, чем нативные эпитопы. Эти изменения могут позволить пептиду более эффективно связываться с ограничивающей молекулой MHC класса I или более благоприятно взаимодействовать с TCR данной опухолеспецифической подгруппы CTL. APL могут быть выбраны с помощью способов, известных из уровня техники.

**[00315]** В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, генетически модифицированные для кодирования компонентов настраиваемой системы экспрессии белка, и полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть объединены с биологическими адъювантами, описанными в данном документе. Двойная регуляция CAR и цитокинов и лигандов предусмотрена для отделения кинетического контроля опосредованной мишенью активации от внутренней Т-клеточной экспансии. Такое двойное регулирование также сводит к минимуму необходимость в режимах прекондиционирования у пациентов. В качестве неограничивающего примера полезную нагрузку, регулируемую DRD, например CD40L, в комбинации с CAR, например, CAR CD19, можно комбинировать с цитокинами, например, IL-12, для повышения противоопухолевой эффективности CAR. В качестве другого неограничивающего примера виды вакцинации на основе дендритных клеток в комбинации с рекомбинантным IL-7 человека для улучшения исхода у пациентов с саркомами детей с высоким риском могут быть применены в способах, описанных в данном документе.

**[00316]** В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одного или нескольких антигенспецифических TCR или CAR, могут быть объединены с композициями по настоящему изобретению, содержащими иммунотерапевтические средства, например CD40L, которые преобразуют иммуносупрессивное микроокружение опухоли.

**[00317]** В одном аспекте эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, специфичных для разных целевых молекул в одной и той же клетке, могут быть объединены. В другом аспекте различные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одной и той же конструкции CAR, такие как NK-клетки и Т-клетки, могут применяться в комбинации для лечения опухоли, например, Т-клетка, модифицированная для экспрессии CD40L в комбинации с CAR CD19, может быть использована в комбинации с NK-клеткой, модифицированной для экспрессии того же CAR CD19, для лечения злокачественных новообразований В-клеток.

**[00318]** В других вариантах осуществления иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, можно комбинировать со средствами, блокирующими контрольные точки.

**[00319]** В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, генетически модифицированные для экспрессии одного или нескольких компонентов настраиваемой системы экспрессии белка, например, полезной нагрузки по настоящему изобретению, могут быть комбинированы с противораковыми вакцинами и другими иммунотерапевтическими и адъювантными средствами лечения по настоящему изобретению.

**[00320]** В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать комбинацию композиций по настоящему изобретению с другими средствами, эффективными при лечении видов рака, инфекционных заболеваний и других иммунодефицитных нарушений, такими как противораковые средства. В контексте данного документа термин «противораковое средство» относится к любому средству, которое способно отрицательно влиять на рак у субъекта, например, путем уничтожения раковых клеток, индуцирования апоптоза в раковых клетках, снижения скорости роста раковых клеток, уменьшения частоты или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимулирования иммунного ответа против раковых клеток или опухоли, предупреждения или подавления прогрессирования рака или увеличения продолжительности жизни субъекта с раком.

**[00321]** В некоторых вариантах осуществления противораковое средство или терапия могут представлять собой химиотерапевтическое средство или лучевую терапию, иммунотерапевтическое средство, хирургическое вмешательство или любое другое терапевтическое средство, которое в комбинации с настоящим изобретением улучшает терапевтическую эффективность лечения.

**[00322]** В одном варианте осуществления один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка, содержащей CAR CD19, можно применять в комбинации с производными аминопиримидина, такими как ингибитор киназы тирозинового рецептора Беркитта (ВТК).

**[00323]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно применять в комбинации с иммунотерапевтическими средствами, отличными от терапии по настоящему изобретению, описанной в данном документе, например, с антителами, специфичными к некоторым целевым молекулам на поверхности опухолевой клетки.

**[00324]** Примеры химиотерапевтического средства включают, но не ограничиваясь ими, ацивирин; акларубин; акодозола гидрохлорид; акронин; адозелезин; альдеслейкин; альтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназу; асперрин, сулиндак, куркумин, алкилирующие средства, в том числе: азотистые иприты, такие как мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, такие как кармустин (BC U), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CC U); тиленимины/метилмеламин, такие как триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен, тиофосфорамид (тиотепу), гексаметилмеламин (НММ,

альтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфан; триазины, такие как дакарбазин (DTIC); антиметаболиты, в том числе аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметрексат, аналоги пирролидина, такие как 5-фторурацил, фтордезоксисуридин, гемцитабин, цитозинарабинозид (AraC, цитарабин), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордеоксиинэтидин, такой как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформицин (пентостатин), эритрогидроксинониладенин (EHNA), флударабин фосфат и 2-хлордезоксаденозин (кладрибин, 2-CdA); натуральные продукты, включая антимитотические лекарственные средства, такие как паклитаксел, алкалоиды барвинка, включая винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустина фосфат; эпиподофилотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как актимомицин D, дауномицин (рубидомицин), доксорубицин, митоксантрон, идарубицин, блеомицины, пликамицин (митрамицин), митомицин C и актиномицин; ферменты, такие как L-аспарагиназа, цитокины, такие как интерферон (IFN)-гамма, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета и GM-CSF, антиангиогенные факторы, такие как ангиостатин и эндостатин, ингибиторы FGF или VEGF, такие как растворимые формы рецепторов ангиогенных факторов, включая растворимые рецепторы VGF/VEGF, координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин, антрацендионы, такие как митоксантрон, замещенную мочевины, такую как гидроксимочевина, производные метилгидразина, включая N-метилгидразин (MIFf) и прокарбазинал, адренкортикальные супрессоры, такие как митотан (o, p'-DDD) и аминоклутетимид; гормоны и антагонисты, включая антагонисты адренкортикостероидов, такие как преднизон и эквиваленты, дексаметазон и аминоклутетимид; прогестин, такой как гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстроген, такой как эквиваленты диэтилстильбэстрола и этинилэстрадиола; антиэстроген, такой как тамоксифен; андрогены, включая пропионат тестостерона и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, такие как флутамид, аналоги гонадотропин-релизинг-гормона и лейпролид; нестероидные антиандрогены, такие как флутамид; ингибиторы киназ, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы метилирования, ингибиторы протеасом, моноклональные антитела, оксиданты, антиоксиданты, ингибиторы теломеразы, миметики ВНЗ, ингибиторы убиквитинлигазы, ингибиторы STAT и ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, такие как иматиниба мезилат (представленный на рынке как гливаклеев) и эрлотиниб (ингибитор рецептора EGF), который в настоящее время представлен на рынке тарцева; противовирусные препараты, такие как осельтамивира фосфат, амфотерицин В и паливизумаб; миметики Sdi 1; семустин; ингибитор I, полученный из стареющих клеток; спарфоновую кислоту; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин I; скваламин; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; суперактивный антагонист вазоактивных кишечных пептидов; веларезол; верамин; вердин; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и стимуламер циностатина; низкомолекулярный ингибитор PI3Kβ, GSK2636771; ингибитор всех

видов PI3K (BKM120); ингибиторы BRAF, вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб (тафинлар); или любой аналог или производное и вариант вышеизложенного.

**[00325]** Радиотерапевтические средства и факторы включают облучение и волны, которые вызывают повреждение ДНК, например  $\gamma$ -облучение, рентгеновские лучи, УФ-облучение, микроволны, электронные излучения, радиоизотопы и т.п. Терапия может быть достигнута путем облучения локализованного участка опухоли описанными выше формами облучений. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, на предшественников ДНК, репликацию и репарацию ДНК, а также сборку и поддержание хромосом. Диапазоны дозировки рентгеновских лучей варьируются от дневных доз от 50 до 200 рентген в течение продолжительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны дозировки радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также от поглощения неопластическими клетками.

**[00326]** В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой иммуномодулирующее средство, такое как леналидомид (LEN). Недавние исследования показали, что леналидомид может усиливать противоопухолевые функции CAR-модифицированных Т-клеток. Некоторые примеры противоопухолевых антител включают тоцилизумаб, силтуксимаб.

**[00327]** Другие средства, которые можно применять в комбинации с композициями по настоящему изобретению, могут также включать, но не ограничиваясь ими, средства, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и их лигандов, таких как Fas/лиганд Fas, DR4 или DR5/TRAIL и соединения GAP, цитостатические средства и средства, направленные на дифференцировку, ингибиторы клеточной адгезии, такие как ингибиторы киназы очаговой адгезии (FAK) и ловастатин, или средства, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, такие как антитело C225.

**[00328]** Комбинации могут включать введение композиций по настоящему изобретению и других средств одновременно или по отдельности. В качестве альтернативы иммунотерапия по настоящему изобретению может предшествовать или следовать за другим средством/терапией с интервалами в диапазоне от нескольких минут, нескольких дней, нескольких недель до нескольких месяцев.

#### 4. Заболевания

**[00329]** В настоящем изобретении предложен способ уменьшения объема опухоли или опухолевой нагрузки у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

**[00330]** В настоящем изобретении также предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества эффекторных иммунных клеток,

генетически модифицированных для включения настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению.

## 5. Рак

**[00331]** Различные виды рака можно лечить фармацевтическими композициями, компонентами настраиваемой системы экспрессии белка и конструкциями, включая их DRD и полезные нагрузки по настоящему изобретению. В контексте данного документа термин «рак» относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся пролиферацией анапластических клеток, которые имеют тенденцию вторгаться в окружающие ткани и метастазировать в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся такими злокачественными новообразованиями. Виды рака могут представлять собой опухоли или гематологические злокачественные новообразования и включают, но не ограничиваясь ими, все типы лимфом/лейкозов, карцином и сарком, такие как виды рака или опухоли, обнаруженные в заднем проходе, мочевом пузыре, желчных протоках, костях, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (грудной клетке), ротовой полости, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке.

**[00332]** Типы карцином, которые можно лечить с помощью композиций по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль энтодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточную недифференцированную карциному, базальноклеточную карциному и недифференцированную карциному носовых пазух.

**[00333]** Типы сарком, которые можно лечить с помощью композиций по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, саркомы мягких тканей, такие как саркома альвеолярной мягкой части, ангиосаркому, дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкоклеточную опухоль, экстраклеточную хондросаркому, экстраклеточную остеосаркому, фибросаркому, гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, фиброфибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому и опухоль Аскина, саркому Юинга (примитивную нейроэктодермальную опухоль), злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому и хондросаркому.

## 6. Инфекционные заболевания

**[00334]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению может применяться для лечения инфекционных заболеваний.

Настраиваемые системы экспрессии белка по настоящему изобретению могут быть введены в клетки, подходящие для переноса адоптивных клеток, такие как макрофаги, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры и/или Т-клетки. Инфекционные заболевания, которые подлежат лечению с помощью настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению, могут включать заболевания, вызываемые вирусами, бактериями, грибами и/или паразитами. Полезные нагрузки IL-15-IL-15Ra по настоящему изобретению могут быть использованы для увеличения пролиферации иммунных клеток и/или устойчивости иммунных клеток, применимых в лечении инфекционных заболеваний.

**[00335]** «Инфекционные заболевания» в данном документе относятся к заболеваниям, вызываемым любым патогеном или агентом, который инфицирует клетки млекопитающих, предпочтительно клетки человека, и вызывает патологическое состояние. Их примеры включают бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы, прионы и паразиты. Примеры включают тех, которые участвуют в (а) вирусных заболеваниях, такие как, например, заболевания, возникающие в результате инфицирования аденовирусом, вирусом герпеса (например, HSV-I, HSV-II, CMV или VZV), поксвирусом (например, ортопоксвирусом, таким вирусом натуральной оспы или коровьей оспы, или вирусом контагиозного моллюска), пикорнавирусом (например, риновирусом или энтеровирусом), ортомиксовирусом (например, вирусом гриппа), парамиксовирусом (например, вирусом парагриппа, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори и респираторно-синцитиальным вирусом (RSV)), коронавирусом (например, SARS), паповавирусом (например, папилломавирусами, такими как те, которые вызывают остроконечные кондиломы, обычные или подошвенные бородавки), гепаднавирусом (например, вирусом гепатита В), флавивирусом (например, вирусом гепатита С или вирусом денге) или ретровирусом (например, лентивирусом, таким как HIV); (b) бактериальных заболеваниях, таких как, например, заболевания, вызванные инфицированием бактериями, например, рода *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus* или *Bordetella*; (c) других инфекционных заболеваниях, таких как хламидиоз, грибковые заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, кандидоз, аспергиллез, гистоплазмоз, криптококковый менингит, паразитарные заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, малярию, пневмонию, вызванную *Pneumocystis carinii*, лейшманиоз, криптоспориоз, токсоплазмоз и трипаносомную инфекцию, а также прионы, которые вызывают у человека такие заболевания, как болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD), синдром Герстмана-Штрауслера-Шейнкера, фатальная семейная бессонница и куру.

## 7. Иммуноонкология и клеточные виды терапии

**[00336]** Недавний прогресс в области иммунологии рака позволил разработать несколько

подходов, которые способствуют сдерживанию рака иммунной системой. Такие подходы иммунотерапии включают нацеливание на раковые антигены с помощью моноклональных антител или путем адоптивного переноса сконструированных *ex vivo* Т-клеток (например, которые содержат химерные антигенные рецепторы или сконструированные Т-клеточные рецепторы).

**[00337]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка по настоящему изобретению могут быть применены для модуляции, изменения или использования иммунной системы для нацеливания на один или несколько видов рака. Этот подход также можно рассматривать с другими такими биологическими подходами, например, способами лечения, модифицирующими иммунный ответ, такими как введение интерферонов, интерлейкинов, колониестимулирующих факторов, других моноклональных антител, вакцин, генной терапии и неспецифических иммуномодулирующих средств, которые также рассматриваются как противораковые виды терапии, которые следует комбинировать с фармацевтическими композициями, настраиваемыми системами экспрессии белка, включая их полезные нагрузки по настоящему изобретению.

**[00338]** Иммунотерапия рака относится к разнообразному набору терапевтических стратегий, направленных на индуцирование собственной иммунной системы пациента к борьбе с раком. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, настраиваемые системы экспрессии белка, включая их полезные нагрузки по настоящему изобретению, разработаны в качестве иммуноонкологических терапевтических средств.

#### 8. Клеточные виды терапии

**[00339]** Существует несколько типов клеточной иммунотерапии, включая терапию лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль (TIL), генно-инженерные Т-клетки, несущие химерные антигенные рецепторы (CAR), и технологию рекомбинантных TCR.

**[00340]** В соответствии с настоящим изобретением настраиваемая система экспрессии белка может использоваться при разработке и внедрении клеточных видов терапии, таких как адоптивная клеточная терапия. Настраиваемые системы экспрессии белка и их полезная нагрузка могут использоваться в клеточной терапии для воздействия на удаление TCR-нарушение гена TCR, конструирование TCR, для регулирования рецепторов, меченных эпитопом, на платформах APC для стимуляции Т-клеток, в качестве инструмента для усиления стимуляции APC *ex vivo*, для улучшения способов экспансии Т-клеток, при стимуляции *ex vivo* антигеном, в комбинациях TCR/CAR, при манипуляции или регуляции TIL, в терапии аллогенными клетками, в комбинированной терапии Т-клетками с другими линиями лечения (например, облучением, цитокинами) для кодирования сконструированных TCR или модифицированных TCR, или для усиления Т-клеток, отличных от TCR (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

**[00341]** В некоторых вариантах осуществления улучшенные показатели ответа получены в

поддержку клеточных видов терапии.

**[00342]** Экспансия и персистенция клеточных популяций могут быть достигнуты посредством регулирования или точной настройки полезных нагрузок, например, рецепторов или компонентов пути в Т-клетках, НК-клетках или других связанных с иммунитетом клетках. В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка по настоящему изобретению разработаны для пространственного и/или временного контроля экспрессии белков, которые усиливают ответы Т-клеток или НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка разработаны для пространственного и/или временного контроля экспрессии белков, которые ингибируют Т-клеточный или НК-клеточный ответ.

**[00343]** Иммунную систему можно использовать для лечения болезней, помимо рака. Настраиваемые системы экспрессии белка, их компоненты могут применяться в иммунотерапии для лечения заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, аутоиммунные заболевания, аллергии, реакцию «трансплантат против хозяина», а также заболеваний и нарушений, которые могут приводить к иммунодефициту, такие как синдром приобретенного иммунодефицита (AIDS).

**[00344]** В настоящем изобретении предложены композиции для иммунотерапии. Такие композиции могут содержать эффекторные модули с CD40L в качестве полезной нагрузки. Композиции могут дополнительно содержать химерный антигенный рецептор в качестве дополнительной полезной нагрузки. Композиции могут экспрессироваться в иммунных клетках, подходящих для адоптивной клеточной терапии. Клетки, экспрессирующие эффекторные модули, могут быть непосредственно доставлены субъекту. В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие эффекторные модули, можно вводить совместно с иммунными клетками, экспрессирующими CD40. Экспрессия CD40 в этих клетках может быть эктопической или эндогенной. Экспрессия CD40 также может быть индуцирована кокультивированием с другими иммунными клетками, экспрессирующими эффекторные модули по настоящему изобретению. Некоторые неограничивающие примеры CD40 положительных клеток включают клетки, такие как дендритные клетки, макрофаги, миелоидные клетки, В-клетки, тромбоциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и фибробласты.

**[00345]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки, описанные в данном документе, могут использоваться для активации дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка может представлять собой миелоидную дендритную клетку, плазматическую дендритную клетку, CD14<sup>+</sup> дендритную клетку, клетку Лангерганса или микроглию. В некоторых вариантах осуществления миелоидные DC (mDC) экспрессируют типичные миелоидные антигены CD11c, CD13, CD33 и CD11b, соответствующие CD11c мыши + «классическим» или «стандартным» DC. У человека как моноциты, так и mDC экспрессируют CD11c, но в DC отсутствуют CD14 или CD16, и их можно разделить на фракции CD11c<sup>+</sup> и CD141<sup>+</sup>. Эти две фракции имеют гомологию с классическими DC мыши, экспрессирующими либо CD11b

(CD1c+ DC), либо CD8/CD103 (CD141+ DC). В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки могут представлять собой плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), которые обычно не имеют миелоидных антигенов и могут отличаться экспрессией CD123, CD303 и CD304. В одном варианте осуществления дендритные клетки могут представлять собой CD14+. Такие клетки обнаруживаются в тканях, а лимфатические узлы представляют собой третью подгруппу миелоидных клеток CD11c+, первоначально описанных как «интерстициальные DC». Они более похожи на моноциты или макрофаги, чем CD1c+ и CD141+ mDC, и могут происходить из классических моноцитов. Эквивалентные клетки недавно были обнаружены у мышей в виде новой подгруппы классических CD11b DC, происходящих из моноцитов, которые экспрессируют ESAM. В одном варианте осуществления дендритные клетки могут представлять собой клетки Лангерганса или микроглию. Клетки Лангерганса (LC) и микроглия представляют собой две специализированные самообновляющиеся популяции DC, обнаруженные в многослойном плоском эпителии и паренхиме головного мозга соответственно. LC могут дифференцироваться в мигрирующие DC, в то время как микроглия считается типом макрофагов.

**[00346]** В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой химерный антигенный рецептор (CAR), который при трансдукции в иммунные клетки (например, Т-клетки и НК-клетки) может перенаправлять иммунные клетки против мишени (например, опухолевой клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным целевым фрагментом CAR.

**[00347]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие настраиваемую систему экспрессии белка, включая их полезную нагрузку или белок, представляющий интерес, могут быть использованы для модуляции, изменения или эксплуатации иммунной системы для нацеливания на один или несколько аутореактивных иммунных компонентов, таких как аутоантитела и аутореактивные иммунные клетки для ослабления аутоиммунных заболеваний.

**[00348]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка могут применяться в иммунотерапевтических видах лечения для ослабления или смягчения реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD). GVHD относится к состоянию после трансплантации стволовых клеток или костного мозга, при котором иммунные клетки аллогенного донора реагируют против ткани хозяина. В некоторых вариантах осуществления настраиваемая система экспрессии белка может быть разработана для кодирования цитокина или иммунологического средства, предназначенного для модуляции Treg для лечения GVHD.

**[00349]** В некоторых вариантах осуществления настраиваемые системы экспрессии белка могут быть значительно менее иммуногенными, чем другие биоконтуры или переключатели, известные из уровня техники, вследствие экспрессии нативных белков человека, представляющих интерес.

**[00350]** Различные аутоиммунные заболевания и заболевания, связанные с аутоиммунными

заболеваниями, можно лечить с помощью фармацевтических композиций, содержащих настраиваемые системы экспрессии белка по настоящему изобретению. В контексте данного документа термин «аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию, при котором организм вырабатывает антитела, которые атакуют его собственные ткани.

**[00351]** Различные заболевания крови можно лечить с помощью фармацевтических композиций, содержащих один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению.

#### 9. Центральная нервная система (ЦНС)

**[00352]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие один или несколько компонентов настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению, можно применять для модуляции, изменения или использования белков в центральной нервной системе, включая белки спинномозговой жидкости (CSF).

#### 10. Возможности применения стволовых клеток

**[00353]** Настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению и/или их компоненты могут быть использованы в регулируемом перепрограммировании клеток, привитии стволовых клеток или другом применении, где применима контролируемая или настраиваемая экспрессия таких факторов перепрограммирования.

**[00354]** Конструкции системы настраиваемой экспрессии белка по настоящему изобретению можно применять для перепрограммирования клеток, включая стволовые клетки или индуцированные стволовые клетки. Индукция индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) была впервые достигнута Takahashi и Yamanaka (Cell, 2006. 126(4):663-76; включенную в данный документ посредством ссылки в полном объеме) с использованием вирусных векторов для экспрессии KLF4, c-MYC, OCT4 и SOX2, иначе совокупно известных как KMOS.

**[00355]** Выделяемые лентивирусные и транспозонные векторы, повторное нанесение временных плазмидных, эписомальных и аденовирусных векторов также применяли для попыток получения iPSC.

**[00356]** Способы с отсутствием ДНК для получения iPSC человека также были получены с использованием последовательной трансдукции белков рекомбинантными белками, содержащими пептидные фрагменты, проникающие в клетки, и доставки инфекционного трансгена с использованием вируса Сендай.

**[00357]** Настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению может содержать полезную нагрузку, содержащую любой из генов, включая, но не ограничиваясь ими, OCT, такой как OCT4, SOX, такие как SOX1, SOX2, SOX3, SOX15 и SOX18, NANOG, KLF, такие как KLF1, KLF2, KLF4 и KLF5, MYC, такие как c-MYC и n-MYC, REM2, TERT и LIN28 и их варианты для поддержки перепрограммирования клеток. Последовательности таких факторов

перепрограммирования описаны, например, в Международной заявке PCT/US2013/074560, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[00358]** Настраиваемая система экспрессии белка по настоящему изобретению может содержать полезную нагрузку, содержащую любой из факторов, которые способствуют мобилизации стволовых клеток. При терапии аутологичными стволовыми клетками источники стволовых клеток для трансплантации могут включать костный мозг, мононуклеарные клетки периферической крови и пуповинную кровь. Стволовые клетки стимулируются из этих источников (например, костного мозга) в кровотоке. Таким образом, имеется достаточное количество стволовых клеток для сбора для будущей реинфузии. Одна из стратегий цитокинов или их комбинация могут использоваться для мобилизации стволовых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, G-CSF (филграстим), GM-CSF и химиотерапию, предшествующую введению цитокинов (хемомобилизацию).

#### 11. Инструменты и средства для получения терапевтических средств

**[00359]** В настоящем изобретении предложены инструменты и средства, которые можно применять для создания терапевтических средств, такие как, но не ограничиваясь ими, иммунотерапевтические средства для уменьшения объема опухоли или нагрузки у субъекта, нуждающегося в этом. При получении терапевтического средства участвует значительное количество переменных, таких как структура полезной нагрузки, тип клеток, способ переноса генов, способ и время экспансии *ex vivo*, прекондиционирование и количество и тип опухолевой нагрузки у субъекта. Такие параметры можно оптимизировать с помощью инструментов и средств, описанных в данном документе.

#### 12. Линии клеток

**[00360]** В настоящем описании предложена клетка млекопитающего, которая была генетически модифицирована с помощью композиций по настоящему изобретению. Подходящие клетки млекопитающего включают в себя первичные клетки и иммортализованные линии клеток. Подходящие линии клеток млекопитающих включают, но не ограничиваясь ими, линию клеток эмбриональной почки человека 293, линию клеток фибробластов NIH 3T3, линию клеток колоректальной карциномы человека HCT116, линию клеток карциномы яичника SKOV-3, иммортализованные линии Т-клеток (например, клетки Jurkat и клетки SupT1), линию клеток лимфомы Raji, клетки NALM-6, клетки K562, клетки HeLa, клетки PC12, клетки HL-60, линии клеток NK (например, NKL, NK92, NK962 и YTS) и т.п. В некоторых случаях клетка не является иммортализованной клеточной линией, а является клеткой, полученной от индивидуума и обозначаемой в данном документе первичной клеткой. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный от индивидуума. Другие примеры включают, но не ограничиваясь ими, цитотоксические клетки, стволовые клетки, мононуклеарные клетки периферической крови или клетки-предшественники, полученные от индивидуума.

#### 13. Клеточные анализы

**[00361]** В некоторых вариантах осуществления эффективность композиций по настоящему изобретению в качестве иммунотерапевтических средств может быть оценена с помощью клеточных анализов. Уровни экспрессии и/или идентичности композиций по настоящему изобретению могут быть определены любыми способами, известными из уровня техники для идентификации белков и/или количественной оценки уровней белков. В некоторых вариантах осуществления такие способы могут включать вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и иммуноанализы.

**[00362]** В данном документе предложены способы функциональной характеристики клеток, трансформированных или трансдуцированных конструкцией настраиваемой системы экспрессии белка по настоящему изобретению и композициями по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления функциональная характеристика проводится в первичных иммунных клетках или иммортализованных линиях иммунных клеток и может быть определена с помощью экспрессии маркеров клеточной поверхности. Примеры маркеров клеточной поверхности для Т-клеток включают, но не ограничиваясь ими, CD3, CD4, CD8, CD 14, CD20, CD11b, CD16, CD45 и HLA-DR, CD 69, CD28, CD44, IFN-гамма. Маркеры истощения Т-клеток включают PD1, TIM3, BTLA, CD160, 2B4, CD39 и LAG3. Примеры маркеров клеточной поверхности для антигенпрезентирующих клеток включают, но не ограничиваясь ими, MHC I класса, MHC II класса, CD40, CD45, B7-1, B7-2, рецептор IFN $\gamma$  и рецептор IL-2, ICAM-1 и/или рецептор Fc $\gamma$ . Примеры маркеров клеточной поверхности для дендритных клеток включают, но не ограничиваясь ими, MHC I класса, MHC II класса, B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF- 44, CMRF-56, DCIR и/или дектин-1 и т.п.; в то время как в некоторых случаях также отсутствуют CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и/или CD57. Примеры маркеров клеточной поверхности для NK-клеток включают, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CCR4, CXCR4, CXCR3, NKG2D, CD71, CD69, CCR5, фосфо-JAK/STAT, фосфо-ERK, фосфо-p38/MAPK, фосфо-AKT, фосфо-STAT3, гранулизин, гранзим В, гранзим К, IL-10, IL-22, IFN $\gamma$ , LAP, перфорин и TNF $\alpha$ .

**[00363]** В некоторых вариантах осуществления метаболические пути Т-клеток могут быть модифицированы для снижения предрасположенности Т-клеток к истощению. Метаболические пути могут включать, но не ограничиваясь ими, гликолиз, цикл мочевины, цикл лимонной кислоты, бета-окисление, биосинтез жирных кислот, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов и метаболические пути гликогена. В качестве неограничивающего примера полезные нагрузки, которые снижают скорость гликолиза, могут использоваться для ограничения или предупреждения истощения Т-клеток. В одном варианте осуществления Т-клетки по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с ингибиторами гликолиза, такими как 2-дезоксиглюкоза и рапамицин.

**[00364]** В некоторых вариантах осуществления конструкции системы настраиваемой экспрессии

белка по настоящему изобретению, применимые для иммунотерапии, могут быть помещены под транскрипционный контроль константного локуса альфа-локуса Т-клеточного рецептора (TRAC) в Т-клетках. Eucnem et al. показали, что экспрессия CAR из локуса TRAC предупреждает истощение Т-клеток и ускоренную дифференцировку Т-клеток, вызванную чрезмерной активацией Т-клеток.

**[00365]** В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут содержать антитела или фрагменты, которые нацелены на маркеры поверхности Т-клеток, ассоциированные с истощением Т-клеток. Маркеры поверхности Т-клеток, ассоциированные с истощением Т-клеток, которые можно использовать в качестве полезных нагрузок, включают, но не ограничиваясь ими, CTLA-1, PD-1, TGIT, LAG-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA и CD96.

**[00366]** В одном варианте осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой CAR CD276 (с внутриклеточными доменами CD28, 4-1BB и CD3 дзета), который не демонстрирует активацию маркеров, ассоциированных с ранним истощением Т-клеток.

#### 14. Клетки

**[00367]** В соответствии с настоящим изобретением предложены клетки, генетически модифицированные для экспрессии по меньшей мере одного белка, представляющего интерес, или полезной нагрузки при регуляции кодируемого лиганда DRD по настоящему изобретению. Клетки по настоящему изобретению могут включать, но не ограничиваясь ими, иммунные клетки, стволовые клетки и опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой эффекторные иммунные клетки, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки, такие как CD8+ Т-клетки и CD4+ Т-клетки (например, Th1, Th2, Th17, Foxp3+ клетки), Т-клетки памяти, такие как Т-стволовые клетки памяти, центральные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти, терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), NK-Т-клетки, лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), регуляторные Т-клетки (Treg) и дендритные клетки (DC, например, миелоидную дендритную клетку, плазмацитоидную дендритную клетку, CD14+ дендритную клетку, клетку Лангерганса или микроглию), другие иммунные клетки, которые могут вызывать эффекторную функцию, или их смесь. Т-клетки могут представлять собой Tαβ-клетки и Tγδ-клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток человека, мезенхимальных стволовых клеток и нервных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть деплетированы эндогенными Т-клеточными рецепторами.

**[00368]** В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к конкретному отдельному субъекту.

**[00369]** В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению могут представлять собой клетки млекопитающих, в частности, клетки человека. Клетки по настоящему

изобретению могут представлять собой первичные клетки или иммортализованные линии клеток.

**[00370]** Сконструированные иммунные клетки могут быть получены способом, включающим введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует домен, чувствительный к лекарственным средствам (DRD).

**[00371]** Вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV, аденовирусный вектор и онколитический вирусный вектор. В других аспектах также могут применяться невирусные векторы, например, наночастицы и липосомы. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению генетически модифицированы для экспрессии по меньшей мере одного иммунотерапевтического средства по настоящему изобретению, которое настраивается с помощью стабилизирующего лиганда. В некоторых примерах в клетку вводят два, три или более иммунотерапевтических средства, сконструированных в одних и тех же конструкциях настраиваемой системы экспрессии белка. В других примерах в клетку могут быть введены две, три или более конструкции настраиваемой системы экспрессии белка.

**[00372]** В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению могут представлять собой Т-клетки и/или НК-клетки, модифицированные для экспрессии CD40L, и необязательно в комбинации с антигенспецифическим Т-клеточным рецептором (TCR) или антигенспецифическим химерным антигенным рецептором (CAR), описанными в данном документе.

#### 15. Полинуклеотиды

**[00373]** Компоненты настраиваемой системы экспрессии белка, включая эффекторные модули, их SRE и полезные нагрузки, могут быть основаны на нуклеиновых кислотах. Термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле включает любое соединение и/или вещество, которые содержат полимер из нуклеотидов, например, связанные нуклеозиды. Эти полимеры часто обозначают полинуклеотидами. Иллюстративные нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды по настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНА), гликолевые нуклеиновые кислоты (GNA), пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA, включая LNA, имеющую  $\beta$ -D-рибо-конфигурацию,  $\alpha$ -LNA, имеющую  $\alpha$ -L-рибо-конфигурацию (диастереомер LNA), 2'-амино-LNA, имеющую 2'-аминофункционализацию, и 2'-амино- $\alpha$ -LNA, имеющую 2'-аминофункционализацию) или их гибриды.

**[00374]** В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой информационную РНК (mRNA). В контексте данного документа термин «информационная

РНК» (mRNA) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует полипептид, представляющий интерес, и который способен к трансляции с образованием кодируемого полипептида, представляющего интерес, *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут представлять собой mRNA или любую молекулу нуклеиновой кислоты и могут быть или могут не быть химически модифицированными.

**[00375]** Традиционно основные компоненты молекулы mRNA содержат по меньшей мере кодирующую область, 5'UTR, 3'UTR, 5'-кэп и поли-A-хвост. Основываясь на этой модульной структуре дикого типа, настоящее изобретение расширяет объем функциональных возможностей традиционных молекул mRNA, обеспечивая конструкции полезной нагрузки, которые поддерживают модульную организацию, но которые содержат одну или несколько структурных и/или химических модификаций или изменений, которые придают полезные свойства полинуклеотиду, например, возможность настройки функции. В контексте данного документа «структурная» особенность или модификация представляет собой такую, в которой два или более связанных нуклеотида вставлены, делетированы, дублированы, инвертированы или рандомизированы в полинуклеотид без значительной химической модификации самих нуклеотидов. Поскольку химические связи обязательно будут разрушены и преобразованы для осуществления структурной модификации, структурные модификации имеют химическую природу и, следовательно, являются химическими модификациями. Однако структурные модификации приведут к образованию другой последовательности нуклеотидов. Например, полинуклеотид «АТСГ» может быть химически модифицирован до «АТ-5meC-G». Тот же полинуклеотид может быть структурно модифицирован с «АТСГ» на «АТСССГ». В данном случае был вставлен динуклеотид «СС», что привело к структурной полинуклеотида.

**[00376]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут нести последовательности 5'UTR, которые играют роль в инициации трансляции. Последовательности 5'UTR могут включать такие особенности, как последовательности Козак, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома иницирует трансляцию генов, последовательности Козака имеют консенсус XCCR (A/G) CCAUG, где R представляет собой пурин (аденин или гуанин), расположенный за три основания до старт-кодона (AUG), а X представляет собой любой нуклеотид. В одном варианте осуществления последовательность Козак представляет собой ACCGCC. С помощью конструирования признаков, которые обычно обнаруживаются в значительно экспрессируемых генах целевых клеток или тканей, можно повысить стабильность и продуцирование белка полинуклеотидов по настоящему изобретению.

**[00377]** Кроме того, предложены полинуклеотиды, которые могут содержать внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), который играет важную роль в иницировании синтеза белка в отсутствие 5'-кэп-структуры в полинуклеотиде. IRES может выступать в качестве единственного

сайта связывания рибосомы или может функционировать в качестве одного из множества сайтов связывания. Полинуклеотиды по настоящему изобретению, содержащие более одного функционального сайта связывания рибосомы, могут кодировать несколько пептидов или полипептидов, которые независимо транслируются рибосомами, приводя к образованию молекул бицистронных и/или полицистронных нуклеиновых кислот.

**[00378]** В одном варианте осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать варианты полипептиды, которые имеют определенную идентичность с референтной полипептидной последовательностью. В контексте данного документа термин «референтная полипептидная последовательность» относится к исходной полипептидной последовательности. Референтные последовательности могут представлять собой последовательности дикого типа или любую последовательность, на которую делается ссылка при разработке другой последовательности.

**[00379]** Термин «идентичность», известный из уровня техники, относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, определяемой путем сравнения последовательностей. В данной области техники идентичность также означает степень связи последовательностей между последовательностями, определяемую количеством совпадений между цепочками из двух или более остатков (аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Идентичность измеряет процент идентичных совпадений между двумя или более последовательностями с выравниванием гэпов (если таковые имеются), учитываемых конкретной математической моделью или компьютерной программой (т.е. «алгоритмами»). Идентичность родственных последовательностей можно легко вычислить с помощью известных способов. Такие способы включают, но не ограничиваясь ими, способы, описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

**[00380]** В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность может иметь такую же или аналогичную активность, что и референтная последовательность. В качестве альтернативы вариант может иметь измененную активность (например, повышенную или пониженную) по сравнению с референтной последовательностью. Как правило, варианты конкретного полинуклеотида или полипептида по настоящему изобретению будут на по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее чем на 100% идентичны последовательности этого конкретного референтного полинуклеотида или полипептида, как определено программами и параметрами выравнивания последовательностей, известными специалистам в данной области

техники. Такие средства выравнивания включают средства программного пакета BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)

#### 16. Отбор кодонов

**[00381]** В некоторых вариантах осуществления один или несколько кодонов полинуклеотидов по настоящему изобретению могут быть заменены другими кодонами, кодирующими нативную аминокислотную последовательность, для настройки экспрессии SRE посредством процесса, обозначаемого отбором кодонов. Поскольку пулы кодонов mRNA и антикодонов tRNA имеют тенденцию различаться среди организмов, типов клеток, субклеточных локализаций и в динамике, отбор кодонов, описанный в данном документе, представляет собой пространственно-временной (ST) отбор кодонов.

**[00382]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения определенные свойства полинуклеотидов могут быть кодон-оптимизированными. Оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для повышения экспрессии в клетке-хозяине путем замены по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов нативной последовательности на кодоны, которые наиболее часто используются в генах этой клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Использование кодонов можно измерить с использованием индекса адаптации кодонов (CAI), который измеряет отклонение кодирующей полинуклеотидной последовательности от референтного набора генов. Таблицы использования кодонов доступны в базе данных использования кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), а CAI может быть рассчитан с помощью программы EMBOSS CAI (<http://emboss.sourceforge.net/>). Способы оптимизации кодонов известны из уровня техники и могут быть применимы в попытках достичь одной или нескольких из нескольких целей.

**[00383]** Стоп-кодон полинуклеотидов по настоящему изобретению может быть модифицирован для включения последовательностей и мотивов для изменения уровней экспрессии SRE, полезных нагрузок и эффекторных модулей по настоящему изобретению. Такие последовательности могут быть включены для индукции считывания стоп-кодона, при этом стоп-кодон может указывать на аминокислоты, например, селеноцистеин или пирролизин. В других случаях стоп-кодоны могут быть полностью пропущены для возобновления трансляции посредством альтернативной открытой рамки считывания. Считывание стоп-кодона можно использовать для настройки экспрессии компонентов эффекторных модулей в определенном соотношении (например, как диктуется контекстом стоп-кодона). Примеры предпочтительных мотивов стоп-кодонов включают UGAN, UAAN и UAGN, где N представляет собой либо C, либо U.

**[00384]** Подавление терминации происходит во время трансляции многих вирусных mRNA как средство получения второго белка с удлинённым карбоксиконцом. В ретровирусах гены gag и pol

кодируются одной mRNA и разделены амбер-кодом терминации UAG. Подавление трансляции амбер-кодона позволяет синтезировать предшественник gag-pol. Подавление трансляции опосредуется супрессорными tRNA, которые могут распознавать терминирующие кодоны и вставлять конкретную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули, описанные в данном документе, могут содержать амбер-кодоны терминации. Такие кодоны можно использовать вместо последовательностей IRES и p2A в бицистронных конструкциях или в дополнение к ним. Считывание стоп-кодона можно комбинировать с P2A для получения низкого уровня экспрессии нижерасположенного гена (например, IL-12). В некоторых вариантах осуществления амбер-стоп-кодоны могут быть объединены с экспрессией tRNA или аминокил-tRNA-синтетазой для дальнейшего контроля. В одном аспекте полезная нагрузка может представлять собой регулируемую tRNA-синтазу.

#### 17. Очаг у субъекта

**[00385]** В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой очаг у субъекта. Очаг у субъекта может находиться в организме субъекта, таком как, но не ограничиваясь ими, кровь, плазма крови, орган, выбранный из печени, почек, головного мозга, сердца, легкого, костей и костного мозга.

#### 18. Промоторы

**[00386]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат промотор.

**[00387]** В контексте данного документа промотор определяется как последовательность ДНК, распознаваемая аппаратом транскрипции клетки, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности по настоящему изобретению. Векторы могут содержать нативные или ненативные промоторы, функционально связанные с полинуклеотидами по настоящему изобретению. Выбранные промоторы могут быть сильными, слабыми, конститутивными, индуцибельными, тканеспецифичными, специфичными для стадии развития и/или специфичными для организма. Одним из примеров подходящего промотора является промотор немедленного раннего цитомегаловируса (CMV), такой как, но не ограничиваясь им, SEQ ID NO: 6384-6386. Эта последовательность промотора представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способную управлять высокими уровнями экспрессии полинуклеотидной последовательности, которая функционально связана с ней. Другим примером промотора является фактор роста элонгации-1 альфа (EF-1 альфа), такой как, но не ограничиваясь им, SEQ ID NO: 6387-6391. Также могут быть использованы другие конститутивные промоторы, включая, но не ограничиваясь ими, промотор вируса обезьян 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса иммунодефицита человека (HIV), длинного концевой повтора (LTR), промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, включая, но не ограничиваясь

ими, промотор фосфоглицераткиназы (PGK) (неограничивающие примеры включают SEQ ID NO: 6392-6399), промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина, промотор убиквитина С (Ubc), промотор малого ядерного белка U6 человека и промотор креатинкиназы. В некоторых случаях могут использоваться индуцибельные промоторы, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор тетрациклина.

**[00388]** В некоторых вариантах осуществления оптимальный промотор может быть выбран на основе его способности достигать минимальной экспрессии SRE и полезных нагрузок по настоящему изобретению в отсутствие лиганда и детектируемой экспрессии в присутствии лиганда.

**[00389]** Дополнительные элементы промотора, например, энхансеры можно использовать для регуляции частоты инициации транскрипции. Такие области могут располагаться на 10-100 пар оснований выше или ниже сайта начала последовательности. В некоторых случаях два или более промоторных элемента могут использоваться для совместной или независимой активации транскрипции.

#### 19. Другие регуляторные характеристики

**[00390]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут содержать необязательные адаптеры протеасом. В контексте данного документа термин «адаптер протеасомы» относится к любой нуклеотидной/аминокислотной последовательности, которая нацелена на добавленную полезную нагрузку для деградации. В некоторых аспектах адаптеры непосредственно нацелены на разрушение полезной нагрузки, за счет чего устраняется необходимость в реакциях убиквитинирования. Адаптеры протеасом можно использовать в сочетании с доменами, чувствительными к лекарственным средствам, для снижения основной экспрессии полезной нагрузки. Примеры адаптеров протеасом включают домен UbL Rad23 или hHR23b, HPV E7, который связывается как с целевым белком Rb, так и с субъединицей S4 протеасомы с высокой аффинностью, что обеспечивает прямое нацеливание на протеасомы в обход механизма убиквитинирования; белок ганкирин, который связывается с Rb и субъединицей S6 протеасомы.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**[00391]** Если не указано иное, все термины из области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для облегчения ссылки и понимания, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как означающее существенное различие по сравнению с тем, что обычно понимается в данной области техники. Общепринятые определения терминов и/или

способов и/или протоколов молекулярной биологии можно найти в Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3d ed. 2001) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1994), Sambrook and Russel (2006) Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879697717; Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology, 5th ed., Current Protocols, ISBN-10: 0471250929.

**[00392]** При необходимости процедуры, включающие применение коммерчески доступных наборов и/или реагентов, как правило, выполняются в соответствии с инструкциями производителя и/или протоколами и/или параметрами, если не указано иное.

**[00393]** «Аффинность» относится к силе связывания: повышенная аффинность связывания коррелирует с более низким Kd.

**[00394]** Адоптивная клеточная терапия (АСТ): термины «адоптивная клеточная терапия» или «адоптивный перенос клеток» в контексте данного документа относятся к клеточной терапии, включающей перенос клеток пациенту, при этом клетки могут происходить от пациента или от другого индивидуума, и сконструированы (изменены) перед переносом обратно пациенту. Терапевтические клетки могут быть получены из иммунной системы, такие как эффекторный иммунные клетки: CD4+ Т-клетка; CD8+ Т-клетка, естественная клетка-киллер (НК-клетка); и В-клетки и лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), полученные из резецированных опухолей. Чаще всего переносимые клетки являются аутологичными противоопухолевыми Т-клетками после экспансии или манипуляции *ex vivo*. Например, аутологичные лимфоциты периферической крови могут быть генетически сконструированы для распознавания специфических опухолевых антигенов путем экспрессии Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR).

**[00395]** Средство: в контексте данного документа термин «средство» относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению. Неограничивающие примеры включают простую или сложную органическую или неорганическую молекулу, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, рецептор и растворимый фактор.

**[00396]** Агонист: термин «агонист» в контексте данного документа относится к соединению, которое в комбинации с рецептором может вызывать клеточный ответ. Агонист может представлять собой лиганд, который непосредственно связывается с рецептором. В качестве альтернативы агонист может комбинироваться с рецептором косвенно, например, (a) образуя комплекс с другой молекулой, которая непосредственно связывается с рецептором, или (b) иным образом приводя к модификации другого соединения таким образом, что другое соединение непосредственно связывается с рецептором. Агонист может обозначаться как агонист конкретного рецептора или семейства рецепторов, например, агонист костимулирующего рецептора.

**[00397]** Антагонист: термин «антагонист» в контексте данного документа относится к любому средству, которое ингибирует или снижает биологическую активность мишени (мишеней), которую (которые) он связывает.

**[00398]** Примерно: в контексте данного документа термин «примерно» или «приблизительно» применительно к одному или нескольким значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному референтному значению. В определенных вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» относится к диапазону значений, который попадает в пределы 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или меньше в любом направлении (больше или меньше) указанного референтного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое количество превышает 100 из возможного значения).

**[00399]** Ассоциированный с: в контексте данного документа термины «ассоциированный с», «конъюгированный», «связанный», «присоединенный» и «соединенный» при использовании в отношении двух или более фрагментов, означают, что фрагменты физически ассоциированы или связаны друг с другом, либо непосредственно, либо посредством одного или нескольких дополнительных фрагментов, которые выступают в качестве связывающих средств, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, так что фрагменты остаются физически ассоциированными в условиях, в которых применяется структура, например, физиологических условиях. «Ассоциация» не обязательно должна осуществляться строго путем непосредственной ковалентной химической связи. Это также может предполагать ионную или водородную связь или связанность на основе гибридизации, достаточно стабильную, так что «ассоциированные» объекты остаются физически ассоциированными.

**[00400]** Аутологичный: термин «аутологичный» в контексте данного документа предназначен для обозначения любого материала, полученного от того же индивидуума, которому он позже будет повторно введен.

**[00401]** «Связывание» относится к специфичному для последовательности нековалентному взаимодействию между макромолекулами (например, между белком и нуклеиновой кислотой). Не все компоненты связывающего взаимодействия должны быть специфичными для последовательности (например, контакты с фосфатными остатками в основном каркасе ДНК), если взаимодействие в целом является специфичным для последовательности. Такие взаимодействия обычно характеризуются константой диссоциации ( $K_d$ ) of  $10^{-6}$  M<sup>-1</sup> или ниже.

**[00402]** «Связывающий белок» представляет собой белок, который способен связываться с другой молекулой. Связывающий белок может связываться, например, с молекулой ДНК (ДНК-связывающий белок), молекулой РНК (РНК-связывающий белок) и/или молекулой белка (белок-связывающий белок). В случае белок-связывающего белка он может связываться с самим собой (с

образованием гомодимеров, гомотримеров и т.д.) и/или он может связываться с одной или несколькими молекулами другого белка или белков. Связывающий белок может обладать более чем одним типом связывающей активности. Например, белки «цинковые пальцы» обладают ДНК-связывающей, РНК-связывающей и белок-связывающей активностью.

**[00403]** «Расщепление» относится к разрыву ковалентного каркаса молекулы ДНК. Расщепление можно инициировать множеством способов, включая, но не ограничиваясь ими, ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи. Возможно как одноцепочечное расщепление, так и двухцепочечное расщепление, при этом двухцепочечное расщепление может происходить в результате двух различных событий одноцепочечного расщепления. Расщепление ДНК может приводить к образованию либо тупых концов, либо смещенных концов. В определенных вариантах осуществления гибридные полипептиды применяют для целенаправленного расщепления двухцепочечной ДНК.

**[00404]** Кодированная последовательность находится «под контролем» транскрипционных и трансляционных контрольных последовательностей в клетке, когда РНК-полимераза транскрибирует кодирующую последовательность в mRNA, которая затем подвергается сплайсингу транс-РНК (если кодирующая последовательность содержит интроны) и транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

**[00405]** Под «конструкцией» обычно понимают любую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся молекула нуклеиновой кислоты, фаг или линейная или кольцевая одноцепочечная или двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты ДНК или РНК, полученная из любого источника, способного к геномной интеграции или автономной репликации, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, в которой одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты функционально связаны. Конструкции могут включать, но не ограничиваясь ими, дополнительные регуляторные молекулы нуклеиновых кислот, например, из 3'-нетранслируемой области (3' UTR). Конструкции могут включать, но не ограничиваясь ими, 5'-нетранслируемые области (5' UTR) молекулы нуклеиновой кислоты mRNA, которые могут играть важную роль в инициации трансляции, а также могут быть генетическим компонентом экспрессионной конструкции. Эти дополнительные вышерасположенные и нижерасположенные регуляторные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены из источника, который является нативным или гетерологичным по отношению к другим элементам, присутствующим в конструкции промотора.

**[00406]** Цитокины: термин «citoкины» в контексте данного документа относится к семейству небольших растворимых факторов с плейотропными функциями, которые продуцируются многими типами клеток, которые могут влиять и регулировать функцию иммунной системы.

**[00407]** Доставка: термин «доставка» в контексте данного документа относится к действию или способу доставки соединения, вещества, объекта, фрагмента, груза или полезной нагрузки.

«Средство доставки» относится к любому средству, которое облегчает, по меньшей мере частично, доставку *in vivo* одного или нескольких веществ (включая, но не ограничиваясь ими, соединение и/или композицию по настоящему изобретению) в клетку, субъекту или клетки других биологических систем.

**[00408]** В контексте данного документа фраза «полученный из», относящаяся к DRD или полезной нагрузке, означает, что DRD или полезная нагрузка получены по меньшей мере частично от указанной исходной молекулы или последовательности. Например, DRD может быть получен из эпитопа или области встречающегося в природе белка и модифицирован любым из способов, описанных в данном документе, для оптимизации функции DRD.

**[00409]** Дестабилизированный: в контексте данного документа термин «дестабилизированный», «дестабилизирующий», «дестабилизирующая область» или «дестабилизирующий домен» означает область или молекулу, которая менее стабильна, чем исходная, референтная форма, форма дикого типа или нативная форма той же области или молекулы.

**[00410]** «Кодирующая последовательность» или «кодирующая область» ДНК относится к двухцепочечной последовательности ДНК, которая кодирует полипептид и может транскрибироваться и транслироваться в полипептид в клетке *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo* при помещении под контроль подходящих регуляторных последовательностей. «Подходящие регуляторные последовательности» относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), внутри или ниже (3'-некодирующие последовательности) от кодирующей последовательности, и которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов и структуры «стебель-петля». Границы кодирующей последовательности определяются старт-кодоном на 5' (амино) конце и стоп-кодоном трансляции на 3' (карбоксильном) конце. Кодирующая последовательность может включать, но не ограничиваясь ими, прокариотические последовательности, cDNA из mRNA, последовательности геномной ДНК и даже последовательности синтетической ДНК. Если кодирующая последовательность предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут располагаться в направлении 3' от кодирующей последовательности.

**[00411]** Термин «нижераположенный» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 3' от референтной нуклеотидной последовательности. В частности, нижераположенные нуклеотидные последовательности обычно относятся к последовательностям, которые следуют за исходной точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена

расположен ниже сайта инициации транскрипции.

**[00412]** Термин «вышерасположенный» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 5' от референтной нуклеотидной последовательности. В частности, выше расположенные нуклеотидные последовательности обычно относятся к последовательностям, которые расположены на 5' стороне кодирующей последовательности или исходной точки транскрипции. Например, большинство промоторов расположены выше сайта инициации транскрипции.

**[00413]** Сконструированный: в контексте данного документа варианты осуществления по настоящему изобретению являются «сконструированными», когда они предназначены для того, чтобы иметь особенность или свойство, структурное или химическое, которое варьируется от молекулы исходной точки, молекулы дикого типа или нативной молекулы.

**[00414]** «Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно не присутствует в клетке, но может быть введена в клетку с помощью одного или большего количества из следующих способов: генетический, биохимический или других. «Нормальное присутствие в клетке» определяется с учетом конкретного этапа развития и условий окружающей среды клетки. Так, например, молекула, которая присутствует только во время эмбрионального развития мышц, является экзогенной молекулой по отношению к зрелой мышечной клетке. Аналогично молекула, индуцированная тепловым шоком, является экзогенной молекулой по отношению к клетке, не подвергшейся тепловому шоку. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующую версию эндогенной молекулы с нарушенной функцией или версию с нарушенной функцией нормально функционирующей эндогенной молекулы.

**[00415]** Экзогенная молекула может представлять собой, среди прочего, малую молекулу, такую как полученную в результате комбинаторного химического процесса, или макромолекулу, такую как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеуказанных молекул или любой комплекс, содержащий одну или несколько из вышеуказанных молекул. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одноцепочечными или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут иметь любую длину. Нуклеиновые кислоты включают те, которые способны образовывать дуплексы, а также нуклеиновые кислоты, образующие триплексы. См., например, патенты США №№ 5176996 и 5422251. Белки включают, но не ограничиваясь ими, ДНК-связывающие белки, факторы транскрипции, факторы ремоделирования хроматина, метилированные ДНК-связывающие белки, полимеразы, метилиты, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

**[00416]** Экзогенная молекула может представлять собой молекулы того же типа, что и эндогенная молекула, например, экзогенный белок или нуклеиновая кислота. Например, экзогенная

нуклеиновая кислота может содержать инфицированный вирусный геном, плазмиду или эписому, введенные в клетку, или хромосому, которая обычно не присутствует в клетке. Способы введения экзогенных молекул в клетки известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваясь ими, опосредованный липидами перенос (т.е. липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором. Экзогенная молекула также может представлять собой молекулу того же типа, что и эндогенная молекула, но быть полученной от другого вида, чем клетка. Например, последовательность нуклеиновой кислоты человека может быть введена в линию клеток, первоначально полученную от мыши или хомяка.

**[00417]** В отличие от этого, «эндогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно присутствует в конкретной клетке на определенной стадии развития в определенных условиях окружающей среды. Например, эндогенная нуклеиновая кислота может представлять собой хромосому, геном митохондрии или другую органеллу или встречающуюся в природе эписомальную нуклеиновую кислоту. Дополнительные эндогенные молекулы могут представлять собой белки, например, факторы транскрипции и ферменты.

**[00418]** «Эписома» представляет собой реплицирующуюся нуклеиновую кислоту, нуклеопротеидный комплекс или другую структуру, содержащую нуклеиновую кислоту, которая не является частью хромосомного кариотипа клетки. Примеры эписомов включают плазмиды и определенные вирусные геномы.

**[00419]** «Эукариотические» клетки включают, но не ограничиваясь ими, клетки грибов (такие как дрожжи), клетки растений, клетки животных, клетки млекопитающих и клетки человека (например, Т-клетки).

**[00420]** В контексте данного документа термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или нескольким из следующих событий: (1) получению матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессингу РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; (4) фолдингу полипептида или белка; и (5) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

**[00421]** Вектор экспрессии, конструкция экспрессии, плазида или конструкция рекомбинантной ДНК обычно понимаются как относящиеся к нуклеиновой кислоте, которая была получена в результате вмешательства человека, в том числе с помощью рекомбинантных средств или прямого химического синтеза, с рядом определенных элементов нуклеиновых кислот, которые обеспечивают транскрипцию или трансляцию конкретной нуклеиновой кислоты, например, в клетке-хозяине. Вектор экспрессии может быть частью плазмиды, вируса или фрагмента нуклеиновой кислоты. Обычно вектор экспрессии может содержать транскрибируемую

нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором.

**[00422]** Термин «фрагмент» в применении к полинуклеотидным последовательностям относится к нуклеотидной последовательности уменьшенной длины по сравнению с референтной нуклеиновой кислотой и содержащей в общей части нуклеотидную последовательность, идентичную референтной нуклеиновой кислоте. Такой фрагмент нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением может быть, при необходимости, включен в более крупный полинуклеотид, компонентом которого он является. Такие фрагменты содержат олигонуклеотиды или в качестве альтернативы состоят из них, длина которых может составлять по меньшей мере 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 или более последовательных нуклеотидов нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

**[00423]** «Функциональный фрагмент» белка, полипептида или нуклеиновой кислоты представляет собой белок, полипептид или нуклеиновую кислоту, последовательность которых не идентична полноразмерному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте, но сохраняет ту же функцию, что и полноразмерный белок, полипептид или нуклеиновая кислота. Функциональный фрагмент может иметь больше, меньше или такое же количество остатков, что и соответствующая нативная молекула, и/или может содержать одну или несколько аминокислотных или нуклеотидных замен. Способы определения функции нуклеиновой кислоты (например, кодирующей функции, способности гибридизоваться с другой нуклеиновой кислотой) хорошо известны из уровня техники. Аналогично хорошо известны способы определения функции белков. Например, ДНК-связывающая функция полипептида может быть определена, например, с помощью анализов связывания с фильтром, изменения электрофоретической подвижности или иммунопреципитации. Расщепление ДНК можно оценить с помощью гель-электрофореза. См. Ausubel et al., выше. Способность белка взаимодействовать с другим белком может быть определена, например, с помощью коиммунопреципитации, двухгибридных анализов или комплементации, как генетической, так и биохимической. См., например, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; патент США № 5585245 и PCT WO 98/44350.

**[00424]** В контексте данного документа «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологический объект со структурой и в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется.

**[00425]** «Слитая» молекула представляет собой молекулу, в которой две или более молекулы субъединицы связаны, предпочтительно ковалентно. Молекулы субъединиц могут представлять собой молекулы одного химического типа или могут представлять собой молекулы разных химических типов. Примеры первого типа слитой молекулы включают, но не ограничиваясь ими, слитые белки, например, слияние ДНК-связывающего домена (например, ZFP, TALE и/или ДНК-связывающих доменов мегануклеазы) и домена нуклеазы (расщепление) (например, эндонуклеазы,

мегануклеазы и т.д., и слитых нуклеиновых кислот (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, описанный выше). Примеры второго типа слитой молекулы включают, но не ограничиваясь ими, слияние триплекс-образующей нуклеиновой кислоты и полипептида и слияние связывающего вещества малой бороздки и нуклеиновой кислоты.

**[00426]** Экспрессия слитого белка в клетке может быть результатом доставки слитого белка в клетку или осуществляться путем доставки полинуклеотида, кодирующего слитый белок, в клетку, где полинуклеотид транскрибируется, а транскрипт транслируется, с образованием слитого белка. Транс-сплайсинг, расщепление полипептида и лигирование полипептида также могут участвовать в экспрессии белка в клетке. Способы доставки полинуклеотидов и полипептидов в клетки представлены в других разделах настоящего изобретения.

**[00427]** «Ген» относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотиды, которые кодируют функциональную молекулу, включая функциональные молекулы, полученные только путем транскрипции (например, биоактивные виды РНК) или путем транскрипции и трансляции (например, полипептид). Термин «ген» включает нуклеиновые кислоты cDNA и геномной ДНК. «Ген» также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует конкретную РНК, белок или полипептид, включая регуляторные последовательности, предшествующие (5'-некодирующие последовательности) и следующие (3'-некодирующие последовательности) за кодирующей последовательностью. «Нативный ген» относится к гену, встречающемуся в природе, с его собственными регуляторными последовательностями. «Химерный ген» относится к любому гену, не являющемуся природным геном, содержащему регуляторные и/или кодирующие последовательности, которые не встречаются вместе в природе. Соответственно, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного и того же источника, но расположенные иным образом, чем в природе. Химерный ген может содержать кодирующие последовательности, полученные из разных источников, и/или регуляторные последовательности, полученные из разных источников. «Эндогенный ген» относится к природному гену в его естественном положении в геноме организма. «Чужеродный» ген или «гетерологичный» ген относится к гену, который обычно не встречается в организме-хозяине, но который вводится в организм-хозяин путем переноса гена. Чужеродные гены могут включать нативные гены, вставленные в чужеродный организм, или химерные гены. «Трансген» представляет собой ген, который был введен в геном с помощью процедуры трансформации. Например, ген интерлейкина-12 (IL-12) кодирует белок IL-12. IL-12 представляет собой гетеродимер субъединицы 35 кДа (p35) и субъединицы 40 кДа (p40), связанных дисульфидной связью с образованием полностью функционального IL-12p70. Ген IL-12 кодирует как субъединицы p35, так и субъединицы p40.

**[00428]** Транскрибируемый полинуклеотид может иметь последовательность, кодирующую

полипептид, такой как функциональный белок, который может транслироваться в кодируемый полипептид, когда находится под контролем соответствующей регуляторной области. Ген может содержать несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, кодирующая последовательность и 3'-нетранслируемая последовательность, такая как сайт полиаденилирования, а также все области ДНК, которые регулируют получение генного продукта, независимо от того, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибируемыми последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничиваясь ими, промоторные последовательности, терминаторы, регуляторные последовательности трансляции, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты посадки рибосомы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, источники репликации, сайты прикрепления матрикса и области локус-контроля.

**[00429]** «Экспрессия гена» относится к преобразованию информации, содержащейся в гене, в генный продукт. Генный продукт может представлять собой продукт прямой транскрипции гена (например, mRNA, tRNA, rRNA, антисмысловую РНК, рибозим, структурную РНК или любой другой тип РНК) или белок, полученный путем трансляции mRNA. Генные продукты также включают РНК, которые модифицируются такими процессами, как кэппирование, полиаденилирование, метилирование и редактирование, а также белки, модифицированные, например, метилированием, ацетилированием, фосфорилированием, убиквитинированием, ADP-рибозилированием, миристилированием и гликозилированием.

**[00430]** Химерный или рекомбинантный ген представляет собой ген, обычно не встречающийся в природе, такой как ген, в котором, например, промотор не связан в природе с частью или всей транскрибируемой областью ДНК. «Экспрессия гена» относится к процессу, при котором ген транскрибируется в РНК и/или транслируется в функциональный белок.

**[00431]** «Доставка гена» или «перенос гена» относится к способам введения рекомбинантной или чужеродной ДНК в клетки-хозяева. Перенесенная ДНК может оставаться не интегрированной или предпочтительно интегрируется в геном клетки-хозяина. Доставка гена может происходить, например, путем трансдукции с помощью вирусных векторов или путем трансформации клеток с помощью известных способов, таких как электропорация, бомбардировка клеток.

**[00432]** Термин «геном» включает хромосомную, а также митохондриальную, хлоропластную и вирусную ДНК или РНК.

**[00433]** Термин «голова к голове» используется в данном документе для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. Два полинуклеотида располагаются в ориентации голова к голове, когда 5'-конец кодирующей цепи одного полинуклеотида примыкает к 5'-концу кодирующей цепи другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается от 5'-конца другого полинуклеотида. Термин «голова к голове» может быть сокращен до (5')-к-(5').

**[00434]** Термин «хвост к хвосту» используется в данном документе для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. Два полинуклеотида располагаются в ориентации хвост к хвосту, когда 3'-конец кодирующей цепи одного полинуклеотида примыкает к 3'-концу кодирующей цепи другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается в направлении к другому полинуклеотиду. Термин «хвост к хвосту» может быть сокращен до (3')-к-(3').

**[00435]** Термин «голова к хвосту» используется в данном документе для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. Два полинуклеотида располагаются в ориентации голова к хвосту, когда 5'-конец кодирующей цепи одного полинуклеотида примыкает к 3'-концу кодирующей цепи другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается в том же самом направлении, что и другого полинуклеотида. Термин «голова к хвосту» может быть сокращен до (5')-к-(3').

**[00436]** Термины «гетерологичная последовательность ДНК», «экзогенный сегмент ДНК» или «гетерологичная нуклеиновая кислота» в контексте данного документа относятся к последовательности, которая происходит из источника, чужеродного по отношению к конкретной клетке-хозяину, или, в случае того же источника, модифицирована по отношению к исходной форме. Таким образом, гетерологичный ген в клетке-хозяине включает ген, который является эндогенным для конкретной клетки-хозяина, но был модифицирован, например, путем использования шаффлинга ДНК. Термины также включают не встречающиеся в природе множественные копии встречающейся в природе последовательности ДНК. Таким образом, эти термины относятся к сегменту ДНК, который является чужеродным или гетерологичным для клетки или гомологичным клетке, но находится в положении внутри нуклеиновой кислоты клетки-хозяина, в котором этот элемент обычно не обнаруживается. Экзогенные сегменты ДНК экспрессируются с образованием экзогенных полипептидов. «Гомологичная» последовательность ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая естественным образом связана с клеткой-хозяином, в которую она введена.

**[00437]** «Гетерологичная ДНК» относится к ДНК, которая не встречается в природе в клетке или в хромосомном участке клетки. Гетерологичная ДНК может включать ген, чужеродный для клетки.

**[00438]** «Гомологичная рекомбинация» относится к вставке последовательности чужеродной ДНК в другую молекулу ДНК, например, вставке вектора в хромосому. Предпочтительно вектор нацелен на конкретный хромосомный сайт для гомологичной рекомбинации. Для специфической гомологичной рекомбинации вектор будет содержать достаточно длинные области гомологии с последовательностями хромосомы для обеспечения комплементарного связывания и включения вектора в хромосому. Более длинные области гомологии и большая степень сходства последовательностей могут повышать эффективность гомологичной рекомбинации.

**[00439]** Иммунные клетки: термин «иммунная клетка» в контексте данного документа относится к любой клетке иммунной системы, которая происходит из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, из которой происходят две основные линии: миелоидные клетки-предшественники (из которых происходят миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидные клетки-предшественники (из которых происходят лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK)). Типичные клетки иммунной системы включают CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> двойные отрицательные Т-клетки, Т- $\gamma\delta$ -клетки,  $\alpha$ -T $\alpha\beta$ -клетки, регуляторные Т-клетки, естественные клетки-киллеры и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут называться «антигенпрезентирующими клетками» или «APC», они являются специализированными клетками, которые могут активировать Т-клетки, при взаимодействии рецептора главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности APC в комплекс с пептидом, с TCR на поверхности Т-клетки.

**[00440]** Иммуноterapia: термин «иммуноterapia» в контексте данного документа относится к типу лечения заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию.

**[00441]** Иммунотерапевтическое средство: термин «иммунотерапевтическое средство» в контексте данного документа относится к лечению заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию с помощью биологического, фармацевтического или химического соединения.

**[00442]** Термин «выделенный» для целей настоящего изобретения обозначает биологический материал (клетку, нуклеиновую кислоту или белок), который был удален из своей исходной среды (среды, в которой он присутствует в природе). Например, полинуклеотид, присутствующий в естественном состоянии в растении или животном, не является выделенным, однако тот же полинуклеотид, отделенный от соседних нуклеиновых кислот, в которых он присутствует в естественных условиях, считается «выделенным».

**[00443]** «Модуляция» экспрессии гена относится к изменению активности гена. Модуляция экспрессии может включать, помимо прочего, активацию гена и репрессию гена. Редактирование генома (например, расщепление, изменение, инактивация, случайная мутация) можно применять для модуляции экспрессии. Инактивация гена относится к любому снижению экспрессии гена по сравнению с клеткой, которая не включает систему ZFP, TALE или CRISPR/Cas, как описано в данном документе. Таким образом, инактивация гена может быть частичной или полной.

**[00444]** Модифицированный: в контексте данного документа термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы или объекта по сравнению с исходной или референтной молекулой или объектом. Молекулы могут быть изменены многими способами, в

том числе химически, структурно и функционально. В некоторых вариантах осуществления соединения и/или композиции по настоящему изобретению модифицируют с помощью введения неприродных аминокислот.

**[00445]** Мутация: в контексте данного документа термин «мутация» относится к изменению и/или нарушению. В некоторых вариантах осуществления мутации могут представлять собой изменения и/или нарушения белков (включая пептиды и полипептиды) и/или нуклеиновых кислот (включая полинуклеиновые кислоты). В некоторых вариантах осуществления мутации включают изменения и/или нарушения последовательности белка и/или нуклеиновой кислоты. Такие изменения и/или нарушения могут включать добавление, замену и/или делецию одной или нескольких аминокислот (в случае белков и/или пептидов) и/или нуклеотидов (в случае нуклеиновых кислот и/или полинуклеиновых кислот, например полинуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления, в которых мутации включают добавление и/или замену аминокислот и/или нуклеотидов, такие добавления и/или замены могут включать один или несколько аминокислотных и/или нуклеотидных остатков и могут включать модифицированные аминокислоты и/или нуклеотиды. Полученная конструкция, молекула или последовательность мутации, изменения или нарушения могут обозначаться в данном документе мутантом.

**[00446]** «Нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты», «олигонуклеотид», «нуклеотид» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме фосфатного эфира рибонуклеозидов (аденозин, гуанозин, уридин или цитидин; «молекулы РНК») или дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин или дезоксицитидин; «молекулы ДНК») или любых их фосфоэфирных аналогов, таких как фосфоротиоаты и тиоэфиры, либо в одноцепочечной форме, либо в двухцепочечной спирали. Возможны двухцепочечные спирали ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Термин «молекула нуклеиновой кислоты» и, в частности, «молекула ДНК или РНК» относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает ее какими-либо конкретными третичными формами. Таким образом, этот термин включает двухцепочечную ДНК, встречающуюся, среди прочего, в линейных или кольцевых молекулах ДНК (например, рестрикционных фрагментах), плаزمидах, суперспиральной ДНК и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных двухцепочечных молекул ДНК, последовательности могут быть описаны в данном документе в соответствии с обычным соглашением предоставления только последовательности в направлении от 5' к 3' вдоль нетранскрибируемой цепи ДНК (т.е. последовательности, гомологичной mRNA). «Молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, которая подверглась молекулярно-биологическим манипуляциям. ДНК включает, но не ограничиваясь ими, cDNA, геномную ДНК, плазмидную ДНК, синтетическую ДНК и полусинтетическую ДНК.

**[00447]** В контексте данного документа термин «выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты» относится к полимеру РНК или ДНК, который является одно- или двухцепочечным, необязательно

содержащим синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты в форме полимера ДНК может состоять из одного или нескольких сегментов cDNA, геномной ДНК или синтетической ДНК.

**[00448]** Экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать, например, один или несколько генов или молекул cDNA, или любой тип кодирующей или некодирующей последовательности, а также один или несколько контрольных элементов (например, промоторов). Кроме того, экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты может продуцировать одну или большее количество молекул РНК (например, малые шпилечные РНК (shРНК), ингибирующие РНК (RNAi), микроРНК (miРНК) и т.д.).

**[00449]** Функционально связанный: в контексте данного документа фраза «функционально связанный» относится к функциональному соединению между двумя или более молекулами, конструкциями, транскриптами, объектами, фрагментами и т.п.

**[00450]** Термин «функционально связанный», поскольку он относится к последовательностям нуклеиновых кислот и полинуклеотидам, относится к ассоциации последовательностей нуклеиновых кислот на одном фрагменте нуклеиновой кислоты таким образом, что на функцию одной влияет другой, в то время как последовательности нуклеиновых кислот не обязательно должны быть смежными или прилегающими друг к другу, но могут иметь промежуточные последовательности между ними. Например, считается, что регуляторная последовательность ДНК «функционально связана с» или «связана с» последовательностью ДНК, которая кодирует РНК или полипептид, если две последовательности расположены так, что регуляторная последовательность ДНК влияет на экспрессию кодирующей последовательности ДНК (т.е. кодирующая последовательность или функциональная РНК находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации. Последовательность, регулирующая транскрипцию, обычно оперативно связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна непосредственно примыкать к ней. Например, энхансер представляет собой регуляторную последовательность транскрипции, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными, или промотор функционально связан с геном, представляющим интерес, если промотор регулирует или опосредует транскрипцию гена, представляющего интерес, в клетке.

**[00451]** Как правило, это относится к функциональной связи регуляторной последовательности транскрипции с транскрибируемой последовательностью. Например, последовательность промотора или энхансера EF-1 функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Обычно промоторные регуляторные последовательности транскрипции, которые функционально связаны с

транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е. они действуют в цис-положении. Однако некоторые регуляторные последовательности транскрипции, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически смежными или располагаться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают. Полилинкер обеспечивает удобное положение для вставки кодирующих последовательностей, поэтому гены функционально связаны с промотором AP-1. Полилинкеры представляют собой полинуклеотидные последовательности, которые содержат серию из трех или более близко расположенных последовательностей распознавания эндонуклеаз рестрикции.

**[00452]** В ассоциации между двумя или более полипептидами или их доменами для создания слитого полипептида термин «функционально связанный» означает, что на состояние или функцию одного полипептида в слитом белке влияет другой полипептид в слитом белке. Например, в отношении слитого белка, содержащего DRD и полезную нагрузку, DRD и полезная нагрузка функционально связаны, если стабилизация DRD лигандом приводит к стабилизации полезной нагрузки, в то время как дестабилизация DRD в отсутствие лиганда приводит к дестабилизации полезной нагрузки. Хотя термин «функционально связанный» определенно может включать варианты осуществления, в которых DRD прилегает к полезной нагрузке или непосредственно слит с ней, другие варианты, такие как когда DRD отделен от полезной нагрузки другими нуклеотидными последовательностями или пептидными или полипептидными последовательностями, также «функционально» связаны с полезной нагрузкой, если стабилизация DRD с помощью лиганда приводит к стабилизации полезной нагрузки, в то время как дестабилизация DRD в отсутствие лиганда приводит к дестабилизации полезной нагрузки.

**[00453]** «Открытая рамка считывания» сокращается до ORF и относится к длине последовательности нуклеиновой кислоты, ДНК, cDNA или РНК, которая включает сигнал начала трансляции или кодон инициации, такой как ATG или AUG, и кодон терминации и потенциально может транслироваться в полипептидную последовательность.

**[00454]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Этот термин также применяется к полимерам аминокислот, в которых одна или большее количество аминокислот являются химическими аналогами или модифицированными производными соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

**[00455]** Термин «плазмида» относится к внехромосомному элементу, часто несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки и обычно имеет форму кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, интегрирующимися геном последовательностями, фаговыми или нуклеотидными последовательностями, линейной, кольцевой или суперспиральной,

одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, полученной из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей соединены или рекомбинированы в уникальную конструкцию, которая способна вводить в клетку промоторный фрагмент и последовательность ДНК для продукта выбранного гена вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью. Исходные плазмиды, описанные в данном документе, являются коммерчески доступными, общедоступными на неограниченной основе или могут быть сконструированы из доступных плазмид путем применения хорошо известных опубликованных процедур. Многие плазмиды и другие клонирующие векторы и векторы экспрессии, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, хорошо известны и легко доступны специалистам в данной области техники. Более того, специалисты в данной области техники смогут легко сконструировать любое количество других плазмид, пригодных для использования в настоящем изобретении. Свойства, конструкция и применение подобных плазмид, а также других векторов в настоящем изобретении будут очевидны специалистам в данной области техники из настоящего описания.

**[00456]** Термин «полипептид» используется в данном документе взаимозаменяемо с терминами «полипептиды» и «белок (белки)» и относится к полимеру из аминокислотных остатков, например, который обычно встречается в белках в природе. «Зрелый белок» представляет собой белок, который является полноразмерным и который необязательно включает гликозилирование или другие модификации, типичные для белка в данной клеточной мембране.

**[00457]** «Промотор» и «промоторная последовательность» используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Обычно кодирующая последовательность расположена в направлении 3'-конца от промоторной последовательности. Промоторы могут быть полностью получены из нативного гена или состоять из различных элементов, полученных из различных промоторов, встречающихся в природе, или даже содержать сегменты синтетической ДНК. Специалистам в данной области техники понятно, что разные промоторы могут управлять экспрессией гена в разных тканях или типах клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на разные условия окружающей среды или физиологические условия. Промотор может включать необходимые последовательности нуклеиновой кислоты возле сайта инициации транскрипции, например, в случае промотора типа полимеразы II, элемент ТАТА. Промотор может необязательно содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут располагаться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта инициации транскрипции.

**[00458]** Промоторы, которые в большинстве случаев вызывают экспрессию гена в большинстве типов клеток, обычно обозначаются «конститутивными промоторами». Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в конкретном типе клеток, обычно обозначаются «клеточно-специфическими промоторами» или «тканеспецифическими промоторами». Промоторы, которые

вызывают экспрессию гена на определенной стадии развития или дифференцировки клеток, обычно называют «промоторами, специфичными для развития» или «промоторами, специфичными для дифференцировки клеток». Промоторы, которые индуцируются и вызывают экспрессию гена после воздействия или обработки клетки средством, биологической молекулой, химическим веществом, лигандом, светом и т.п., которые индуцируют промотор, обычно называют «индуцибельными промоторами» или «регулируемыми промоторами». Также понятно, что так как в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, фрагменты ДНК разной длины могут иметь идентичную промоторную активность. Промоторная последовательность обычно ограничена на своем 3'-конце сайтом инициации транскрипции и продолжается выше (в направлении 5') для включения минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, обнаруживаемых выше фонового. Внутри промоторной последовательности встречается сайт инициации транскрипции (обычно определяемый, например, путем картирования с помощью нуклеазы S1), а также белковые связывающие домены (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы.

**[00459]** Промоторная область гена включает элементы регуляции транскрипции, которые обычно расположены в направлении 5' от структурного гена. Если ген должен быть активирован, белки, известные как факторы транскрипции, прикрепляются к промоторной области гена. Эта сборка напоминает «включение», позволяя ферменту транскрибировать второй генетический сегмент из ДНК в РНК. В большинстве случаев образующаяся в результате молекула РНК служит матрицей для синтеза определенного белка; иногда конечным продуктом является сама РНК. Область промотора может представлять собой нормальный клеточный промотор или онкопромотор.

**[00460]** Термин «очищенный» применительно к биологическим материалам не требует, чтобы материал присутствовал в форме, демонстрирующей абсолютную чистоту, за исключением присутствия других соединений. Он скорее представляет собой относительное определение.

**[00461]** Полезная нагрузка или полезная нагрузка, представляющая интерес (POI): термины «полезная нагрузка» и «полезная нагрузка, представляющая интерес (POI)» в контексте данного документа являются взаимозаменяемыми. Полезная нагрузка, представляющая интерес (POI), относится к любому белку или соединению, функция которого подлежит изменению. В контексте настоящего изобретения POI является компонентом иммунной системы, включая как врожденную, так и адаптивную иммунную системы. Полезные нагрузки, представляющие интерес, могут представлять собой белок, слитую конструкцию, кодирующую слитый белок, или некодирующий ген, или его вариант и фрагмент. Полезная нагрузка, представляющая интерес, или полезная нагрузка, если она основана на аминокислотах, может обозначаться белком, представляющим интерес.

**[00462]** В контексте данного документа термин «вариант полипептида» относится к молекулам,

которые отличаются по своей аминокислотной последовательности от нативной или референтной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности по сравнению с нативной или референтной последовательностью. Обычно варианты будут на по меньшей мере приблизительно 50% идентичны (гомологичны) нативной или референтной последовательности, и предпочтительно они будут на по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 90% идентичны (гомологичны) нативной или референтной последовательности.

**[00463]** В некоторых вариантах осуществления предложены «имитаторы вариантов». В контексте данного документа термин «имитатор варианта» относится к варианту, который содержит одну или несколько аминокислот, которые имитируют активированную последовательность. Например, глутамат может выступать в качестве имитатора фосфотреонина и/или фосфосерина. В качестве альтернативы имитаторы вариантов могут приводить к деактивации или получению инактивированного продукта, содержащего имитатор, например, фенилаланин может выступать в качестве инактивирующей замены тирозина; или аланин может выступать в качестве инактивирующей замены серина. Аминокислотные последовательности фармацевтических композиций, биоконтуров, компонентов биоконтуров, эффекторных модулей, включая их SRE или полезные нагрузки по настоящему изобретению, могут содержать встречающиеся в природе аминокислоты и, как таковые, могут рассматриваться как белки, пептиды, полипептиды или их фрагменты. В качестве альтернативы фармацевтические композиции, биоконтуры, компоненты биоконтуров, эффекторные модули, включая их SRE или полезные нагрузки, могут содержать как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе аминокислоты.

**[00464]** В контексте данного документа термин «вариант аминокислотной последовательности» относится к молекулам с некоторыми отличиями в их аминокислотных последовательностях по сравнению с нативной или референтной последовательностью. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности. В контексте данного документа термины «нативный» или «исходный», относящиеся к последовательностям, являются относительными терминами, относящимися к исходной молекуле, с которой можно проводить сравнение. Нативные или исходные последовательности не следует путать с последовательностями дикого типа. Нативные последовательности или молекулы могут представлять собой последовательность дикого типа (последовательность, встречающуюся в природе), но они не обязательно должны быть идентичны последовательности дикого типа.

**[00465]** Обычно варианты будут на по меньшей мере приблизительно 70% гомологичны нативной последовательности, и предпочтительно они будут на по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 90% гомологичны нативной

последовательности.

**[00466]** В контексте данного документа термин «гомология» в применении к аминокислотным последовательностям определяется как процент остатков в кандидатной аминокислотной последовательности, которые идентичны остаткам в аминокислотной последовательности второй последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента гомологии. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны из уровня техники. Следует понимать, что гомология зависит от расчета процента идентичности, но может отличаться по значению вследствие гэпов и штрафов, внесенных в расчет.

**[00467]** В контексте данного документа термин «гомолог» в применении к аминокислотным последовательностям означает соответствующую последовательность другого вида, имеющую существенную идентичность по отношению к второй последовательности второго вида.

**[00468]** В контексте данного документа термин «аналог» предназначен для включения вариантов полипептида, которые отличаются одним или несколькими аминокислотными изменениями, например, заменами, добавлением или делециями аминокислотных остатков, которые все еще сохраняют свойства исходного полипептида.

**[00469]** В контексте данного документа термин «производное» используется как синоним термина «вариант» и относится к молекуле, которая была модифицирована или изменена каким-либо образом по отношению к референтной молекуле или исходной молекуле.

**[00470]** Фармацевтически приемлемые наполнители: термин «фармацевтически приемлемый наполнитель» в контексте данного документа относится к любому ингредиенту, кроме активных средств (например, как описано в данном документе), присутствующих в фармацевтических композициях и обладающих свойствами быть по сути нетоксичными и невоспалительными у субъектов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые наполнители представляют собой носители, способные суспендировать и/или растворять активные средства. Наполнители могут включать, например, следующее: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красящие вещества (красители), смягчительные средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусоароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующее или диспергирующие средства, подсластители и гидратационную воду. Иллюстративные наполнители включают, но не ограничиваясь ими: бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кроскармелозу, перекрестно сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этиленцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен,

микросталлическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмиат, шеллак, диоксид кремния, карбоксиметилцеллюлозу натрия, цитрат натрия, натрия крахмала гликолят, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

**[00471]** Фармацевтически приемлемые соли: Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе, представляют собой формы описанных соединений, в которых кислотный или основной фрагмент находится в его солевой форме (например, полученной при взаимодействии группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения ими, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.п. Типичные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфоновую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валератные соли и т.п. Иллюстративные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и т.п. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные нетоксичные соли, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемую соль получают из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических способов. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием форм этих соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Перечни подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Фармацевтически приемлемый сольват: термин «фармацевтически приемлемый сольват» в контексте данного документа относится к кристаллической форме соединения, при этом молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации или осаждения из раствора, который содержит органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), N-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), N, N'-диметилформамид (DMF), N, N'-диметилацетамид (DMAC), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (DMPU), ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат и т.п. Если растворителем является вода, то сольват обозначают как «гидрат». В некоторых вариантах осуществления растворитель, включенный в сольват, относится к типу или на уровне, который является физиологически переносимым для организма, которому вводят сольват (например, в стандартной лекарственной форме фармацевтической композиции).

**[00472]** Термин «рекомбинантный» имеет обычное значение в данной области техники и относится к полинуклеотиду, синтезированному или иным образом обработанному *in vitro* (например, «рекомбинантному полинуклеотиду»), к способам применения рекомбинантных полинуклеотидов для продуцирования генных продуктов в клетках или других биологических системах, или к полипептиду («рекомбинантному белку»), кодируемому рекомбинантным полинуклеотидом. При использовании в отношении клетки этот термин указывает на то, что клетка реплицирует гетерологичную нуклеиновую кислоту или экспрессирует пептид или белок, кодируемый гетерологичной нуклеиновой кислотой. Рекомбинантные клетки могут содержать гены, которых не встречаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки. Рекомбинантные клетки также могут содержать гены, обнаруженные в нативной форме клетки, в которой гены модифицированы и повторно вводятся в клетку искусственным путем. Этот термин также охватывает клетки, которые содержат эндогенную для клетки нуклеиновую кислоту, которая была модифицирована без удаления нуклеиновой кислоты из клетки; такие модификации включают модификации, полученные путем замены гена, сайт-специфической мутации и родственных методик.

**[00473]** «Рекомбинантная кассета экспрессии» или просто «кассета экспрессии» представляет собой конструкцию нуклеиновой кислоты, полученную рекомбинантно или синтетически, которая имеет контрольные элементы, способные влиять на экспрессию структурного гена, который функционально связан с контрольными элементами в хозяевах, совместимых с такими последовательностями. Кассеты экспрессии содержат по меньшей мере промоторы и необязательно сигналы терминации транскрипции. Обычно рекомбинантная кассета экспрессии содержит по меньшей мере транскрибируемую нуклеиновую кислоту и промотор. Дополнительные факторы, необходимые или полезные для осуществления экспрессии, также могут быть использованы, как

описано в данном документе. Например, сигналы терминации транскрипции, энхансеры и другие последовательности нуклеиновых кислот, которые влияют на экспрессию гена, также могут быть включены в кассету экспрессии.

**[00474]** «Рекомбинация» относится к процессу обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами, включая, но не ограничиваясь ими, захват донора путем негомولوجичного соединения концов (NHEJ) и гомологичную рекомбинацию. Для целей этого изобретения «гомологичная рекомбинация (HR)» относится к специализированной форме такого обмена, который имеет место, например, во время репарации двухцепочечных разрывов в клетках с помощью механизмов гомологически-направленной репарации. Этот процесс, требующий гомологии нуклеотидной последовательности, использует «донорную» молекулу для репарации матрицы «целевой» молекулы (то есть той, которая испытала двухцепочечный разрыв) и под разными наименованиями известен как «некроссоверная конверсия гена» или «конверсия гена короткого тракта», поскольку приводит к передаче генетической информации от донора к цели. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, считают, что такой перенос может включать в себя коррекцию несоответствия гетеродуплексной ДНК, которая образуется между поврежденной мишенью и донором, и/или «зависимый от синтеза отжиг цепи», в котором донор используется для повторного синтеза генетической информации, которая станет частью цели, и/или связанных процессов. Такая специализированная HR часто приводит к изменению последовательности целевой молекулы, так что часть или вся последовательность донорного полинуклеотида включается в целевой полинуклеотид. В любом из способов, описанных в данном документе, можно применять дополнительные пары нуклеаз для редактирования генома для дополнительного двухцепочечного расщепления дополнительных целевых сайтов внутри клетки.

**[00475]** «Область, представляющая интерес» представляет собой любую область клеточного хроматина, такую как, например, ген или некодирующая последовательность внутри гена или рядом с ним, в которой желательно связывать экзогенную молекулу. Связывание может применяться для целевого расщепления ДНК и/или целевой рекомбинации. Область, представляющая интерес, может находиться, например, в хромосоме, эписоме, органеллярном геноме (например, митохондриальном, хлоропластном) или в геноме инфицированного вируса. Область, представляющая интерес, может находиться внутри кодирующей области гена, внутри транскрибируемых некодирующих областей, таких как, например, лидерные последовательности, концевые последовательности или интроны, или внутри нетранскрибируемых областей, расположенных выше или ниже кодирующей области. Область, представляющая интерес, может быть такой малой по длине, как одна пара нуклеотидов, или до 2000 пар нуклеотидов в длину, или любое целое значение пар нуклеотидов.

**[00476]** Термин «репортерный ген» относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей идентифицирующий фактор, который может быть идентифицирован на основе эффекта

репортерного гена, при этом эффект используется для отслеживания наследования нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, для идентификации клетки или организма, который унаследовал нуклеиновую кислоту, представляющую интерес, и/или для измерения индукции или транскрипции экспрессии генов. Примеры известных и используемых в данной области техники репортерных генов включают: люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу (LacZ), бета-глюкуронидазу (Gus) и т.п. Гены селективируемых маркеров также можно рассматривать как репортерные гены.

**[00477]** Термин «элемент ответа» относится к одному или нескольким действующим в cis-направлении элементам ДНК, которые придают реактивность промотору, опосредованную взаимодействием с ДНК-связывающими доменами фактора транскрипции. Этот элемент ДНК может быть либо палиндромным (совершенным или несовершенным) в своей последовательности, либо состоять из мотивов последовательности или полусайтов, разделенных переменным числом нуклеотидов. Полусайты могут быть аналогичными или идентичными и располагаться либо как прямые, либо как инвертированные повторы, либо как единый полусайт, либо как мультимеры соседних полусайтов в тандеме. Элемент ответа может включать минимальный промотор, выделенный из разных организмов, в зависимости от природы клетки или организма, в которые включен элемент ответа. ДНК-связывающий домен фактора транскрипции связывается, в присутствии или в отсутствие лиганда, с последовательностью ДНК элемента ответа для инициации или подавления транскрипции нижерасположенного (нижерасположенных) гена (генов) под регуляцией этого элемента ответа.

**[00478]** Термин «последовательность» относится к нуклеотидной последовательности любой длины, которая может быть ДНК или РНК; может быть линейной, кольцевой или разветвленной и при этом может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

**[00479]** Термин «селективируемый маркер» относится к идентифицирующему фактору, обычно к антибиотику или гену химической устойчивости, который может быть выбран на основе эффекта маркерного гена, т.е. устойчивости к антибиотику, устойчивости к гербициду, колориметрических маркеров, ферментов, флуоресцентных маркеров и т.п., при этом эффект используется для отслеживания наследования нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и/или для идентификации клетки или организма, унаследовавших нуклеиновую кислоту, представляющую интерес. Примеры селективируемых маркерных генов, известных и используемых в данной области техники, включают: гены, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафоса, сульфонамиду и тому подобное; и гены, которые используются в качестве фенотипических маркеров, т.е. гены, регулирующие антоцианы, ген изопентанилтрансферазы и т.п.

**[00480]** Стабильный: в контексте данного документа «стабильный» относится к соединению или объекту, которые являются достаточно устойчивыми для того, чтобы переносить выделение из

реакционной смеси до необходимой степени чистоты, и предпочтительно способны образовывать эффективное терапевтическое средство.

**[00481]** В контексте данного документа термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированная область» означает делать или становиться стабильным. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряется по отношению к абсолютному значению. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряется по отношению к вторичному статусу или состоянию или по отношению к референтному соединению или объекту.

**[00482]** В контексте данного документа термин «стандартный CAR» относится к стандартной конструкции химерного антигенного рецептора. Компоненты слитого белка CAR, включая внеклеточный фрагмент scFv, трансмембранный домен и один или несколько внутриклеточных доменов, линейно сконструированы в виде единого слитого белка.

**[00483]** Термины «субъект» и «пациент» применяются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающим, таким как пациенты-люди и отличные от человека приматы, а также к экспериментальным животным, таким как кролики, собаки, кошки, крысы, мыши и другие животные. Соответственно, термин «субъект» или «пациент», используемый в данном документе, обозначает любого пациента или субъекта (например, млекопитающее), которому можно вводить клетки или стволовые клетки по настоящему изобретению.

**[00484]** Т-клетка представляет собой иммунную клетку, которая продуцирует Т-клеточные рецепторы (TCR). Т-клетки могут представлять собой наивные клетки (не подвергавшиеся воздействию антигена; у них наблюдается повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и сниженная экспрессия CD45RO по сравнению с TCM), Т-клетки памяти (ТМ) (подвергавшиеся воздействию антигена и долгоживущие) и эффекторные клетки (подвергавшиеся воздействию антигена, цитотоксические). ТМ могут быть далее разделены на подмножества Т-клеток центральной памяти (TCM, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-клетками и эффекторные Т-клетки памяти (TEM, пониженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-клетками или TCM). Эффекторные Т-клетки (TE) относятся к подвергавшимся воздействию антигена CD8+ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют пониженную экспрессия CD62L, CCR7, CD28 и являются позитивными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с TCM. Другие типичные Т-клетки включают регуляторные Т-клетки, такие как CD4+ CD25+ (Foxp3+) регуляторные Т-клетки и Treg17-клетки, а также Tr1, Th3, CD8+ CD28- и Qa-1-рестриктированные Т-клетки.

**[00485]** Т-клеточный рецептор: Т-клеточный рецептор (TCR) относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов имеющему вариабельный антигенсвязывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост; который способен специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. TCR может быть обнаружен

на поверхности клетки или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего  $\alpha$  и  $\beta$  цепи (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  соответственно) или цепи  $\gamma$  и  $\delta$  (также известные как TCR $\gamma$  и TCR $\delta$  соответственно). Внеклеточная часть цепей TCR (например,  $\alpha$ -цепь,  $\beta$ -цепь) содержит два иммуноглобулиновых домена, переменный домен (например, переменный домен  $\alpha$ -цепи или V $\alpha$ , переменный домен  $\beta$ -цепи или V $\beta$ ) на N-конце, и один константный домен (например, константный домен  $\alpha$ -цепи или C $\alpha$  и константный домен  $\beta$ -цепи или C $\beta$ ), прилегающий к клеточной мембране. Подобно иммуноглобулину, переменные домены содержат области, определяющие комплементарность (CDR), разделенные каркасными областями (FR). TCR обычно связывается с комплексом CD3 с образованием комплекса TCR. В контексте данного документа термин «комплекс TCR» относится к комплексу, образованному в результате ассоциации CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\alpha$  и цепи TCR $\beta$ . В качестве альтернативы комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\gamma$  и цепи TCR $\delta$ . «Компонент комплекса TCR» при использовании в данном документе относится к цепи TCR (т.е. TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  или TCR $\delta$ ), цепи CD3 (т.е. CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или CD3 $\zeta$ ) или комплексу, образованному из двух или более цепей TCR или цепей CD3 (например, комплекс TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , комплекс TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , комплекс CD3 $\epsilon$  и CD3 $\delta$ , комплекс CD3 $\gamma$  и CD3 $\epsilon$  или суб-TCR комплекс, состоящий из TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и двух цепей CD3 $\epsilon$ ).

**[00486]** Терапевтически эффективное количество: в контексте данного документа «терапевтически эффективное количество» означает собой количество доставляемого средства (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства или профилактического средства и т. д.), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или подверженному инфекции, заболеванию, расстройству и/или патологическому состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предупреждения и/или задержки начала инфекции, заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество предоставляется в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вводится в режиме введения дозы, включающем множество доз. Специалисты в данной области техники поймут, что в некоторых вариантах осуществления стандартная лекарственная форма может рассматриваться как содержащая терапевтически эффективное количество конкретного средства или объекта, если она включает количество, эффективное при введении как часть такого режима введения дозы.

**[00487]** Лечение или осуществление лечения: в контексте данного документа термины «лечение» или «осуществление лечения» обозначают подход к получению полезного или необходимого результата, включая и предпочтительно полезный или необходимый клинический результат. Такие полезные или необходимые клинические результаты включают, но не ограничиваясь ими, одно или

несколько из следующего: уменьшение пролиферации (или уничтожение) раковых клеток или других патологических клеток, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруживаемых при видах рака, уменьшение размера опухоли, уменьшение симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих этим заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания и/или продление выживаемости индивидуумов.

**[00488]** Настройка: в контексте данного документа термин «настраивать» означает регулировать, уравнивать или адаптировать что-то в ответ на стимул или по отношению к определенному результату. В одном неограничивающем примере DRD по настоящему изобретению регулируют, уравнивают или адаптируют функцию или структуру композиций, к которым они добавлены, присоединены или связаны, в ответ на конкретные стимулы и/или окружение.

**[00489]** «ДНК-связывающий домен TALE» или «TALE» представляет собой полипептид, содержащий один или большее количество повторяющихся доменов/единиц TALE. Повторяющиеся домены участвуют в связывании TALE с его родственной целевой последовательностью ДНК. Одна «повторяющаяся единица» (также называемая «повтором») обычно имеет длину 33-35 аминокислот и демонстрирует по меньшей мере некоторую гомологию последовательности с другими повторяющимися последовательностями TALE в пределах встречающегося в природе белка TALE.

**[00490]** «Целевой сайт» или «целевая последовательность» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая определяет часть нуклеиновой кислоты, с которой связывающая молекула будет связываться, при условии, что существуют достаточные условия для связывания. «Предполагаемый» сайт-мишень представляет собой сайт, для которого ДНК-связывающая молекула сконструирована и/или выбрана для связывания.

**[00491]** Транскрипция относится к процессу, включающему взаимодействие РНК-полимеразы с геном, который направляет экспрессию в виде РНК структурной информации, присутствующей в кодирующих последовательностях гена. Этот процесс включает, но не ограничиваясь ими, следующие стадии: (1) инициацию транскрипции, (2) удлинение транскрипта, (3) сплайсинг транскрипта, (4) кэппинг транскрипта, (5) терминацию транскрипта, (6) полиаденилирование транскрипта, (7) ядерный экспорт транскрипта, (8) редактирование транскрипта и (9) стабилизацию транскрипта.

**[00492]** Регуляторный элемент или последовательность транскрипции включает, но без ограничения ими, последовательность промотора (например, ТАТА-бокс), энхансерный элемент, сигнальную последовательность или массив сайтов связывания факторов транскрипции. Он контролирует или регулирует транскрипцию функционально связанного с ним гена.

**[00493]** Термин «транскрибируемая молекула нуклеиновой кислоты» в контексте данного

документа относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, способной транскрибироваться в молекулу РНК. Известны способы введения конструкций в клетку таким образом, чтобы транскрибируемая молекула нуклеиновой кислоты транскрибировалась в функциональную молекулу mRNA, которая транслируется и, следовательно, экспрессируется в виде белкового продукта. Также могут быть сконструированы конструкции, способные экспрессировать молекулы антисмысловой РНК для ингибирования трансляции конкретной молекулы РНК, представляющей интерес.

**[00494]** «Сайт инициации транскрипции» или «сайт инициации» представляет собой положение, окружающее первый нуклеотид, который является частью транскрибируемой последовательности, который также определяется как положение +1. Что касается этого сайта, все остальные последовательности гена и его контролирующих областей могут быть пронумерованы. Нижерасположенные последовательности (т.е. дополнительные последовательности, кодирующие белок, в направлении 3'), могут быть обозначены как положительные, в то время как вышерасположенные последовательности (в основном, из контролирующих областей в направлении 5') обозначены как отрицательные.

**[00495]** «Трансген» относится к гену, который был введен в клетку-хозяина. Трансген может содержать последовательности, которые являются нативными для клетки, последовательности, которые не встречаются в природе в клетке, или их комбинации. Трансген может содержать последовательности, кодирующие один или несколько белков, которые могут быть функционально связаны с соответствующими регуляторными последовательностями для экспрессии кодирующих последовательностей в клетке.

**[00496]** «Трансдукция» относится к доставке молекулы нуклеиновой кислоты в реципиентную клетку-хозяина, например, с помощью вектора доставки гена, такого как лентивирусный вектор или gAAV. Например, трансдукция целевой клетки вирионом gAAV приводит к переносу вектора gAAV, содержащегося в этом вирионе, в трансдуцированную клетку. «Клетка-хозяин» или «целевая клетка» относится к клетке, в которую происходит доставка нуклеиновой кислоты.

**[00497]** Термин «трансформация» относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Клетки-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, называются «трансгенными» клетками, а организмы, содержащие трансгенные клетки, называются «трансгенными организмами».

**[00498]** Термины «трансформированный», «трансгенный» и «рекомбинантный» относятся к клетке-хозяину или организму, такому как бактерия, цианобактерия, животное или растение, в которые была введена гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном, как это общеизвестно из уровня техники и раскрыто (Sambrook 1989; Innis 1995; Gelfand 1995; Innis & Gelfand 1999). Известные способы ПЦР

включают, но без ограничения ими, способы с использованием спаренных праймеров, вложенных праймеров, одиночных специфических праймеров, дегенеративных праймеров, генно-специфических праймеров, вектор-специфических праймеров, частично не совпадающих праймеров и т.п. Термин «нетрансформированный» относится к нормальным клеткам, которые не прошли процесс трансформации.

**[00499]** Термин «трансфекция» относится к поглощению экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК клеткой. Клетка была «трансфицирована» экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК, когда такая РНК или ДНК была введена внутрь клетки. Клетка «трансформирована» экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК, когда трансфицированная РНК или ДНК вызывает фенотипическое изменение. Трансформирующая РНК или ДНК могут быть интегрированы (ковалентно связаны) в хромосомную ДНК, составляющую геном клетки.

**[00500]** «Трансформация» относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, называются «трансгенными», «рекомбинантными» или «трансформированными» организмами.

**[00501]** «Последовательности контроля транскрипции и трансляции» относятся к регуляторным последовательностям ДНК, таким как промоторы, энхансеры, терминаторы и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. В эукариотических клетках сигналы полиаденилирования представляют собой контрольные последовательности.

**[00502]** «Вариант» молекулы, такой как модулятор AP-1, означает молекулу, по сути аналогичную по структуре и биологической активности либо со всей молекулой, либо с ее фрагментом. Таким образом, при условии, что две молекулы обладают аналогичной активностью, они считаются вариантами, поскольку этот термин используется в данном документе, даже если состав или вторичная, третичная или четвертичная структура одной из молекул не идентична той, что обнаружена в другой, или если последовательность аминокислотных остатков не идентична.

**[00503]** «Вектор» относится к любому носителю для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент ДНК для того, чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента. «Репликон» относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует в виде автономной единицы репликации ДНК *in vivo*, т.е. способный к репликации под своим собственным контролем. Термин «вектор» включает как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Большое количество векторов, известных из уровня техники, можно использовать для манипулирования нуклеиновыми кислотами, включения элементов ответа и промоторов в гены и т.д. Возможные векторы включают, например, плазмиды или модифицированные вирусы, включая, например, бактериофаги, такие как производные лямбда, или плазмиды, такие как производные

плазмиды pBR322 или pUC, или вектор Bluescript. Например, вставка фрагментов ДНК, соответствующих элементам ответа и промоторам, в подходящий вектор может быть выполнена путем лигирования соответствующих фрагментов ДНК в выбранный вектор, который имеет комплементарные когезионные концы. В качестве альтернативы концы молекул ДНК могут быть модифицированы ферментативно, или любой сайт может быть получен путем лигирования нуклеотидных последовательностей (линкеров) в концы ДНК. Такие векторы могут быть сконструированы так, чтобы они содержали гены селективных маркеров, которые обеспечивают отбор клеток, которые включили маркер в клеточный геном. Такие маркеры позволяют идентифицировать и/или выбирать клетки-хозяева, которые включают и экспрессируют белки, кодируемые маркером. К распространенным векторам относятся плазмиды, вирусные геномы и (преимущественно в случае дрожжей и бактерий) «искусственные хромосомы». «Векторы экспрессии» представляют собой векторы, которые содержат элементы, которые обеспечивают или облегчают транскрипцию нуклеиновых кислот, которые клонированы в векторы. Такие элементы могут включать, например, промоторы и/или энхансеры, функционально связанные с нуклеиновой кислотой, представляющей интерес.

**[00504]** «Вектор клонирования» относится к «репликону», который представляет собой единицу длины нуклеиновой кислоты, предпочтительно ДНК, которая реплицируется последовательно и которая включает точку инициации репликации, такую как плазида, фаг или космида, к которой относится другая нуклеиновая кислота. сегмент может быть присоединен так, чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента. Клонирование векторы могут быть способны к репликации в одном типе клеток и экспрессии в другом («шаттл-вектор»). Клонирование векторы могут содержать одну или несколько последовательностей, которые можно использовать для отбора клеток, содержащих вектор, и/или один или несколько сайтов клонирования для вставки последовательностей, представляющих интерес.

**[00505]** Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, плазмиде или носителю, сконструированному для обеспечения экспрессии встроенной последовательности нуклеиновой кислоты. Клонированный ген, т.е. вставленная последовательность нуклеиновой кислоты, обычно находится под контролем контрольных элементов, таких как промотор, минимальный промотор, энхансер или т.п. Области или промоторы, контролирующее иницирование, которые используются для управления экспрессией нуклеиновой кислоты в необходимой клетке-хозяине, многочисленны и знакомы специалистам в данной области техники. Практически любой промотор, способный управлять экспрессией этих генов, может быть использован в векторе экспрессии, включая, но без ограничения ими, вирусные промоторы, бактериальные промоторы, промоторы животных, промоторы млекопитающих, синтетические промоторы, конститутивные промоторы, тканеспецифические промоторы, промоторы, связанные с патогенезом или заболеванием, специфические промоторы развития, индуцибельные промоторы, светорегулируемые промоторы;

CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TP1, промоторы щелочной фосфатазы (применимые для экспрессии в *Saccharomyces*); промотор AOX1 (применим для экспрессии в *Pichia*); промоторы бета-лактамазы, lac, ara, tet, trp, IPL, IPR, T7, tac и trc (применимые для экспрессии в *Escherichia coli*); светорегулируемый промотор, промотор, специфичный для семян, промотор, специфичный для пыльцы, промотор, специфичный для яичников, промотор вируса мозаики цветной капусты 35S, минимальный CMV 35S, промотор вируса мозаики прожилок маниоки (CsVMV), промотор хлорофилл a/b связывающего-белка, промотор рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы, промотор, специфичный для побегов, промотор, специфичный для корней, промотор хитиназы, индуцируемый стрессом, промотор вируса тунгробациллы риса, суперпромотор растений, промотор лейцинаминопептидазы картофеля, промотор нитратредуктазы, промотор маннопинсинтазы, промотор нопалинсинтазы, промотор убиквитина, промотор белка зеина и антоциановые промоторы (применимые для экспрессии в клетках растений); промоторы животных и млекопитающих, известные из уровня техники, включая, но не ограничиваясь ими, область раннего промотора SV40 (SV40e), промотор, содержащийся в 3'-длинном концевом повторе (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), промоторы генов E1A или главного позднего промотора (MLP) аденовирусов (Ad), ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор тимидинкиназы (TK), промотор бакуловируса IE1, промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), промотор убиквитина (Ubc), промотор альбумина, регуляторные последовательности промотора мышинового металлотионеина-L и области контроля транскрипции, универсальные промоторы (HPRT, виментин, альфа-актин, тубулин и т.п.), промоторы промежуточных филаментов (десмин, нейрофиламенты, кератин, GFAP и т.п.), промоторы терапевтических генов (MDR, CFTR или фактора VIII и т.п.), промоторы, связанные с патогенезом или заболеванием, и промоторы, которые проявляют тканевую специфичность и использовались у трансгенных животных, такие как контрольная область гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы; область контроля гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы, область контроля гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках, область контроля вируса опухоли молочной железы мыши, активная в клетках яичек, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках; промотор гена альбумина, контрольные области Aro AI и Aro AII, активные в печени, контрольная область гена альфа-фетопротеина, активная в печени, контрольная область гена альфа-1-антитрипсина, активная в печени, контрольная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках, контрольная область гена основного белка миелина, активная в клетках олигодендроцитов в головном мозге, контрольная область гена легкой цепи миозина-2, активная в скелетных мышцах, и контрольная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, активная в гипоталамусе, промотор пируваткиназы, промотор виллина, промотор кишечного белка, связывающего жирные кислоты, промотор  $\alpha$ -актина гладкомышечных клеток и т.п. Кроме того, эти экспрессионные

последовательности можно модифицировать путем добавления энхансерных или регуляторных последовательностей и т.п.

**[00506]** Векторы могут быть введены в необходимые клетки-хозяева с помощью способов, известных из уровня техники, например, трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, использования декстрана DEAF, преципитации фосфатом кальция, липофекции (слияния лизосом), использования генной пушки или переносчика вектора ДНК (см., например, Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963 (1992); Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621 (1988); и Hartmut et al., канадская заявка на патент № 2012311).

**[00507]** Вирусные векторы, и особенно лентивирусные и ретровирусные векторы, применяли в широком спектре путей применения для доставки генов в клетки, а также у живых субъектов-животных. Вирусные векторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваясь ими, векторы на основе ретровирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса оспы, бакуловирусов, вируса коровьей оспы, вируса простого герпеса, вируса Эпштейна-Барра, аденовирусов, геминивирусов и каулимовирусов. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры. В дополнение к нуклеиновой кислоте вектор может также содержать одну или несколько регуляторных областей и/или селективируемые маркеры, применимые при отборе, измерении и мониторинге результатов переноса нуклеиновой кислоты (перенос в какие именно ткани, продолжительность экспрессии и т.д.).

**[00508]** Для размножения полинуклеотида по настоящему изобретению можно применять несколько способов, известных из уровня техники. После того, как определены подходящая система-хозяин и условия роста, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть размножены и получены в большом количестве. Как описано в данном документе, векторы экспрессии, которые можно использовать, включают, но не ограничиваясь ими, следующие векторы или их производные: вирусы человека или животных, такие как лентивирусы, вирус осповакцины или AAV, или аденовирус; вирусы насекомых, такие как бакуловир; векторы дрожжей; векторы бактериофагов (например, лямбда), векторы плазмидной и космидной ДНК, и многие другие. Вектор по настоящему изобретению также можно вводить субъекту любым путем, включая, но не ограничиваясь ими, внутримышечное введение.

**[00509]** Полинуклеотид по настоящему изобретению также может быть введен *in vivo* путем липофекции. Увеличивается применение липосом для инкапсуляции и трансфекции нуклеиновых кислот *in vitro*. Синтетические катионные липиды, предназначенные для ограничения сложностей и опасностей, возникающих при трансфекции, опосредованной липосомами, можно применять для приготовления липосом для трансфекции *in vivo* гена, кодирующего маркер. Применение катионных липидов может способствовать инкапсуляции отрицательно заряженных нуклеиновых кислот, а также способствовать слиянию с отрицательно заряженными клеточными мембранами.

Особенно применимые липидные соединения и композиции для переноса нуклеиновых кислот описаны в WO 95/18863, WO 96/17823 и патенте США № 5459127. Применение липофекции для введения экзогенных генов в конкретные органы *in vivo* имеет определенные практические преимущества. Молекулярное нацеливание липосом на конкретные клетки представляет собой одну область преимуществ. Следует понимать, что направление трансфекции к конкретным типам клеток было бы особенно предпочтительным в ткани с клеточной гетерогенностью, такой как поджелудочная железа, печень, почки и головной мозг. Липиды могут быть химически связаны с другими молекулами с целью нацеливания. Нацеленные пептиды, например, гормоны или нейромедиаторы, и белки, такие как антитела, или непептидные молекулы, могут быть химически связаны с липосомами.

**[00510]** Другие молекулы также применимы для облегчения трансфекции нуклеиновой кислоты *in vivo*, например, катионного олигопептида (например, WO 95/21931), пептидов, полученных из ДНК-связывающих белков (например, WO 96/25508), или катионного полимера (например, WO 95/21931).

**[00511]** Также можно ввести вектор *in vivo* в виде плазмиды с «голой» ДНК (см. патенты США №№ 5693622, 5589466 и 5580859). Также могут быть использованы подходы к доставке ДНК, опосредованной рецепторами.

**[00512]** Кроме того, рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению, может включать одну или несколько точек инициации репликации в клетках-хозяевах, в которых происходит поиск амплификации или экспрессии, маркеры или селективируемые маркеры.

**[00513]** «Замещающие варианты» применительно к белкам представляют собой те, у которых удален по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной или исходной последовательности и на его место в том же положении вставлена другая аминокислота. Замены могут быть одиночными, когда была заменена только одна аминокислота в молекуле, или они могут быть множественными, когда две или более аминокислоты были заменены в одной и той же молекуле.

**[00514]** В контексте данного документа термин «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты, которая обычно присутствует в последовательности, другой аминокислотой аналогичного размера, заряда или полярности. Примеры консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин и лейцин, на другой неполярный остаток. Аналогичным образом, примеры консервативных замен включают замену одного полярного (гидрофильного) остатка на другой, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином. Кроме того, замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, другим или замена одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, на другой кислотный остаток

являются дополнительными примерами консервативных замен. Примеры неконсервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, аланин, метионин, на полярный (гидрофильный) остаток, такой как цистеин, глутамин, глутаминовая кислота или лизин, и/или замену полярного остатка на неполярный остаток.

**[00515]** В контексте данного документа термин «инсерционные варианты» по отношению к белкам означает те, в которых одна или несколько аминокислот встроены непосредственно рядом с аминокислотой в конкретном положении в нативной или исходной последовательности. В контексте данного документа термин «непосредственно примыкающий» относится к примыкающей аминокислоте, которая связана либо с альфа-карбокси, либо с альфа-аминогруппой исходной или референтной аминокислоты.

**[00516]** В контексте данного документа термин «делеционные варианты» по отношению к белкам означает те, у которых одна или несколько аминокислот в нативной или исходной аминокислотной последовательности удалены. Обычно делеционные варианты содержат одну или несколько аминокислот, делетированных в определенной области молекулы.

**[00517]** В контексте данного документа термин «производные» включает варианты нативного или исходного белка, содержащие одну или несколько модификаций с органическими белковыми или небелковыми дериватирующими средствами, и посттрансляционные модификации. Ковалентные модификации традиционно вводятся путем взаимодействия целевых аминокислотных остатков белка с органическим дериватирующим средством, которое способно реагировать с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками, или путем задействования механизмов посттрансляционных модификаций, которые функционируют в выбранных рекомбинантных клетках-хозяевах. Полученные ковалентные производные применимы в программах, направленных на идентификацию остатков, важных для биологической активности, для иммуноанализов или для получения антител к белкам для иммуноаффинной очистки рекомбинантного гликопротеина. Такие модификации доступны обычным специалистам в данной области техники и выполняются без излишнего экспериментирования.

**[00518]** Характеристики белков по настоящему изобретению включают проявления на поверхности, локальную конформационную форму, складки, петли, полупетли, домены, полудомены, сайты, концы или любую их комбинацию. В контексте данного документа термин «признаки», относящийся к белкам, определяется в виде отдельных компонентов молекулы, основанных на аминокислотных последовательностях.

**[00519]** В контексте данного документа термин «проявление на поверхности» применительно к белкам относится к компоненту белка на основе полипептида, появляющемуся на самой внешней поверхности.

**[00520]** В контексте данного документа термин «локальная конформационная форма»

применительно к белкам относится к основанному на полипептиде структурному проявлению белка, который расположен в определяемом пространстве белка.

**[00521]** В контексте данного документа термин «складка» по отношению к белкам, относится к образующейся в результате конформации аминокислотной последовательности при сведении к минимуму энергии. Складка может образовываться на вторичном или третичном уровне процесса фолдинга. Примеры складок вторичного уровня включают бета-листы и альфа-спирали. Примеры третичных складок включают домены и области, образованные в результате агрегации или разделения энергетических сил. Образованные таким образом области включают гидрофобные и гидрофильные карманы и т.п.

**[00522]** В контексте данного документа термин «поворот», поскольку он относится к конформации белка, относится к изгибу, который изменяет направление основной цепи пептида или полипептида и может включать один, два, три или более аминокислотных остатков.

**[00523]** В контексте данного документа термин «петля» по отношению к белкам относится к структурному признаку пептида или полипептида, который меняет направление основной цепи пептида или полипептида и содержит четыре или более аминокислотных остатка. Oliva et al. идентифицировали не менее 5 классов белковых петель (Oliva, B. et al., An automated classification of the structure of protein loops. J Mol Biol. 1997. 266(4):814-30.)

**[00524]** В контексте данного документа термин «полупетля» по отношению к белкам относится к части идентифицированной петли, имеющей по меньшей мере половину количества аминокислотных остатков в петле, из которой она получена. Следует понимать, что петли не всегда могут содержать четное число аминокислотных остатков. Следовательно, в тех случаях, когда петля содержит или определена как содержащая нечетное количество аминокислот, полупетля петли с нечетным номером будет содержать целую часть или следующую целую часть петли (количество аминокислот петли/2+/-0,5 аминокислот). Например, петля, идентифицированная как петля из 7 аминокислот, может образовывать полупетли из 3 или 4 аминокислот ( $7/2=3,5+/-0,5$ , равные 3 или 4).

**[00525]** В контексте данного документа термин «домен» по отношению к белкам, относится к мотиву полипептида, имеющему одну или несколько идентифицируемых структурных или функциональных характеристик или свойств (например, связывающую способность, выступающую в качестве сайта для белок-белковых взаимодействий).

**[00526]** В контексте данного документа термин «полудомен» по отношению к белкам, относится к части идентифицированного домена, имеющей по меньшей мере половину количества аминокислотных остатков, составляющих домен, из которого он получен. Следует понимать, что домены не всегда могут содержать четное количество аминокислотных остатков. Следовательно, в тех случаях, когда домен содержит или идентифицируется как содержащий нечетное количество

аминокислот, полудомен домена с нечетным номером будет содержать целую часть или следующую целую часть домена (количество аминокислот домена/2+/-0,5 аминокислот). Например, домен, идентифицированный как домен из 7 аминокислот, может образовывать полудомены из 3 аминокислот или 4 аминокислот ( $7/2=3,5\pm 0,5$ , равные 3 или 4). Также следует понимать, что субдомены могут быть идентифицированы внутри доменов или полудоменов, при этом эти субдомены обладают менее чем всеми структурными или функциональными свойствами, идентифицированными в доменах или полудоменах, из которых они были получены. Также понятно, что аминокислоты, которые составляют любой из типов доменов в данном документе, не обязательно должны быть смежными вдоль основной цепи полипептида (т.е. несмежные аминокислоты могут структурно складываться с образованием домена, полудомена или субдомена).

**[00527]** В контексте данного документа термин «сайт», относящийся к вариантам осуществления на основе аминокислот, используется в качестве синонима «аминокислотного остатка» и «боковой цепи аминокислоты». Сайт представляет собой положение в пептиде или полипептиде, которое можно модифицировать, с которым можно манипулировать, которое можно изменять, дериватизировать или изменять в молекулах на основе полипептида по настоящему изобретению.

**[00528]** В контексте данного документа термины «концы» или «конец» по отношению к белкам относятся к концу пептида или полипептида. Такой конец не ограничивается только первым или последним сайтом пептида или полипептида, но может включать дополнительные аминокислоты в концевых областях. Молекулы на основе полипептидов по настоящему изобретению могут быть охарактеризованы как имеющие как N-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной аминогруппой (NH<sub>2</sub>)), так и C-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной карбоксильной группой (COOH)). «Дикий тип» относится к вирусу или организму, встречающемуся в природе, без каких-либо известных мутаций.

**[00529]** ДНК-связывающие домены «цинковый палец» и TALE могут быть «сконструированы» для связывания с предварительно определенной нуклеотидной последовательностью, например, посредством конструирования (изменения одной или нескольких аминокислот) области спирали узнавания встречающегося в природе цинкового пальца или белка TALE. Следовательно, сконструированные ДНК-связывающие белки (цинковые пальцы или TALE) представляют собой белки, не встречающиеся в природе. Неограничивающими примерами способов конструирования ДНК-связывающих белков являются разработка и отбор. Разработанный ДНК-связывающий белок представляет собой белок, не встречающийся в природе, конструкция/состав которого основывается главным образом на рациональных критериях. Рациональные критерии для разработки включают применение правил замены и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих дизайнах ZFP и/или TALE и данных связывания. См., например, патенты США №№ 8586526; 6140081; 6453242; 6534261 и 8586526; см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

**[00530]** Термины «кассета», «кассета экспрессии» и «кассета экспрессии гена» относятся к сегменту ДНК, который может быть вставлен в нуклеиновую кислоту или полинуклеотид в определенных сайтах рестрикции или путем гомологичной рекомбинации. Сегмент ДНК содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, представляющий интерес, а кассета и сайты рестрикции предназначены для обеспечения вставки кассеты в подходящую рамку считывания для транскрипции и трансляции. «Кассета трансформации» относится к конкретному вектору, содержащему полинуклеотид, который кодирует полипептид, представляющий интерес, и содержащий элементы в дополнение к полинуклеотиду, которые облегчают трансформацию конкретной клетки-хозяина. Кассеты, кассеты экспрессии, кассеты экспрессии генов и кассеты трансформации по настоящему изобретению также могут содержать элементы, которые обеспечивают усиленную экспрессию полинуклеотида, кодирующего полипептид, представляющий интерес, в клетке-хозяине. Эти элементы могут включать, но без ограничения ими: промотор, минимальный промотор, энхансер, элемент ответа, последовательность терминатора, последовательность полиаденилирования и т.п.

**[00531]** В качестве примера промоторов, специфичных для заболевания, применимые промоторы для лечения рака включают промоторы онкогенов, включая промоторы для лечения анемии. Примеры классов онкогенов включают, но без ограничения ими, факторы роста, рецепторы факторов роста, протеинкиназы, регуляторы белка программированной гибели клеток и факторы транскрипции.

**[00532]** Примеры промоторных последовательностей и других регуляторных элементов (например, энхансеров), которые известны из уровня техники и могут быть использованы в качестве промоторов терапевтического переключения в настоящем изобретении, раскрыты в патенте США № 9402919, серийный номер 14/001943, поданном 2 марта 2012 г.

**[00533]** Также отмечается, что термин «содержащий» предназначен для того, чтобы быть открытым и допускать включения дополнительных элементов или этапов, но не требует этого. В тех случаях, когда в данном документе используется термин «содержащий», термин «состоящий из», таким образом, также охватывается и раскрывается.

**[00534]** Там, где указаны диапазоны, включены конечные точки. Кроме того, следует понимать, что если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста и понимания специалиста в данной области техники, значения, которые выражаются как диапазоны, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в указанных диапазонах в разных вариантах осуществления изобретения, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно следует иное.

**[00535]** Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который относится к известному уровню техники, может быть явно

исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными для специалиста в данной области техники, они могут быть исключены, даже если это исключение явно не изложено в данном документе. Любой конкретный вариант осуществления композиций по настоящему изобретению (например, любой антибиотик, терапевтический или активный ингредиент; любой способ получения; любой способ применения и т.д.) может быть исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения по любой причине, независимо от того, связаны или не связаны они с существованием известного уровня техники.

**[00536]** Следует понимать, что фразы, которые использовались, представляют собой фразы описания, а не ограничения, и что изменения могут быть внесены в рамках прилагаемой формулы изобретения без отступления от истинного объема и сущности настоящего изобретения в его более широких аспектах.

**[00537]** Хотя настоящее изобретение было описано довольно подробно и с некоторой конкретностью в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими подробностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но должно интерпретироваться со ссылками на прилагаемую формулу изобретения, чтобы обеспечить максимально широкую интерпретацию такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем настоящего изобретения. Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

#### ПРИМЕРЫ

**[00538]** Пример 1. Создание новых SRE или DD, чувствительных к лигандам, путем скрининга мутагеназа

**[00539]** Способы получения DRD, применимых для использования в композициях и способах по настоящему изобретению, описаны и проиллюстрированы примерами в следующих опубликованных заявках, WO 2018/161000; WO 2018/231759; WO 2019/241315; WO 2018/160993; WO 2018/237323; и WO 2018/161038, описания вышеупомянутых заявок, относящиеся к способам идентификации, скрининга и выделения иллюстративных DRD, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[00540]** Пример 2. Регуляция *in vitro* трансдуцированных мембраносвязанным CD40L клеток Jurkat и первичных Т-клеток

**[00541]** 50000 клеток Jurkat трансдуцировали лентивирусами, соответствующими конструкциям OT-001661, OT-001685, OT-001662 или OT-001666, и культивировали в течение 48 ч. Клетки

разделяли и инкубировали с лигандами в течение 24 ч перед анализом с помощью проточной цитометрии.

**[00542]** Клетки Jurkat обрабатывали одним из следующих: 1 мкМ Shield-1, 50 мкМ TMP, 1 мкМ базедоксифена (BZD) или контролем-носителем. Поверхностную экспрессию CD40L измеряли с помощью FACS, и результаты представлены в Табл. 9. Все значения нормализовали в отношении способа.

**[00543]** Таблица 9: Поверхностная экспрессия CD40L

Название конструкции	DRD	Лиганд	CD40L положительный процент живых клеток	Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции CD40L
Нетрансдуцированный	-	-	0,78	22,9
OT-001661	-	-	99,4	10075
OT-001685	FKBP (M1del, F37V, L107P)	Основа (этанол 0,2%)	0,056	37,1
		1 мкМ Shield-1	97,2	1996
OT-001662	ecDHFR (M1del, R12Y, Y100I)	Основа (DMSO 0,5%)	0,023	27,9
		50 мкМ TMP	98,4	6068
OT-001666	ER (305-549 ДТ, L384M, N413D, M421G, G521R, Y537S)	Основа (DMSO 0,01%)	0,024	21,5
		1 мкМ базедоксифена	38,4	421

**[00544]** Для всех исследованных конструкций наблюдали очень низкую активность исходного уровня. В присутствии соответствующего лиганда конструкции на основе FKBP и DRD ecDHFR демонстрировали значительную лиганд-зависимую регуляцию. Умеренную лиганд-зависимую регуляцию наблюдали в отношении конструкции на основе DRD ER. Как и ожидалось, клетки Jurkat, трансдуцированные конститутивно экспрессируемой конструкцией OT-001661, продемонстрировали экспрессию CD40L при более высоких уровнях, чем нетрансдуцированные клетки.

**[00545]** Клетки Jurkat, трансдуцированные OT-001661, OT-001685, OT-001662, OT-001666 или

OT-001667, культивировали совместно с клетками HEK-Blue™ CD40 (Invivogen, Сан-Диего, Калифорния). Сокультуры обрабатывали лигандами (1 мкМ Shield-1, 50 мкМ TMP, 1 мкМ базедоксифена (BZD) или контролем-основой) в течение 24 ч и уровни репортера секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) измеряли в среде. Уровни пг/мл растворимого CD40L в обработанных лигандом образцах показаны в Табл. 10. Все образцы, обработанные носителем, характеризовались фоновой активностью SEAP. Рекombинантный растворимый CD40L использовали в качестве стандарта в экспериментах.

**[00546]** Таблица 10: Уровни CD40L в присутствии лиганда

Название конструкции	Растворимый CD40L (пг/мл)
OT-001661	9341,40
OT-001685	4833,64
OT-001662	8657,75
OT-001666	1824,7
OT-001667	2565,91

**[00547]** Обнаружение растворимого CD40L в присутствии лиганда и его фактическое отсутствие в контролях-основах предполагает, что все конструкции являются функциональными в клетках Jurkat и связаны с детектируемыми уровнями CD40L.

**[00548]** Регуляцию конструкции на основе есDHFR (R12Y, Y100I) DRD OT-001662 и конструкции на основе ER (N413D) DRD OT-001666 исследовали в CD8 положительных Т-клетках. Для OT-001662, экспрессирующих клетки, лиганд добавляли через 6 дней после вирусной трансдукции в дозе 50 мкМ TMP. Клетки, экспрессирующие OT-001666, обрабатывали 0,5 мкМ базедоксифена или контролем-основой через 5 дней после трансдукции. Примерно 15-30 тыс. клеток на образец анализировали с помощью FACS. Все образцы сравнивали с контролем пустым вектором, а также с конститутивно экспрессируемой конструкцией OT-001661. В Табл. 11 представлены средние значения интенсивности флуоресценции (MFI), полученные для каждого образца.

**[00549]** Таблица 11: MFI CD40L

Конструкция	Основа	+лиганд
Пустой вектор	283	-
OT-001662	29,0	283
OT-001666	35,4	33,1

**[00550]** Для обеих исследованных конструкций наблюдали очень низкую активность исходного уровня. Экспрессия CD40L в конструкции OT-001662 на основе DRD есDHFR в присутствии лиганда была выше, чем в конструкции OT-001666 на основе DRD ER.

**[00551]** Эксперименты с использованием кривой доза-ответ лиганда проводили с возрастающими дозами лиганда с помощью конструкций OT-001662 и OT-001666 как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках.

**[00552]** Эксперименты проводили с использованием трех разных объемов вируса для трансдукции, т.е. 0,5, 2 и 10 мкл. Результаты представлены в Табл. 12 и Табл. 13.

**[00553]** Таблица 12: Доза-ответ в отношении OT-001662

TMP (нМ)	CD4+			CD8+		
	0,5 мкл	2 мкл	10 мкл	0,5 мкл	2 мкл	10 мкл
50000	68,9	76,8	78,8	25,2	51	59,4
5000	67	76,8	79,1	9,21	40,6	47,4
500	48,2	68,4	58,5	0,66	6,84	5,53
50	35,7	37,4	30,7	0,19	0,64	1,07
5	33,9	27,6	24,6	0,12	0,3	1,02
0,5	32	24,4	24,2	0,17	0,34	1,08
0,05	31,6	25,1	23,8	0,16	0,2	0,95

**[00554]** Таблица 13: Доза-ответ в отношении OT-001666

BZD (нМ)	CD4+		CD8+	
	2 мкл	10 мкл	2 мкл	10 мкл
500	71,8	76,5	60	68,5
50	36	34	3,32	17,7
5	11,1	6,42	0,71	0,23
0,5	9,25	4,86	0,52	0,2
0,05	8,57	4,16	0,69	0,5

**[00555]** Результаты в Табл. 12 и Табл. 13 демонстрируют, что дозозависимая стабилизация, опосредованная лигандом, очевидна в CD4+ Т-клетках при более низких концентрациях лиганда для обеих конструкций. Кроме того, более высокие уровни % CD40L положительных клеток при более высоких дозах получали с использованием CD4+ Т-клеток. На эти результаты может влиять экспрессия эндогенного CD40L в CD4+ Т-клетках. Для сравнения CD8+ Т-клетки демонстрировали

более низкую экспрессию исходного уровня и более низкие уровни % CD40 положительных клеток при более высоких дозах лиганда. Поскольку CD8+ клетки не экспрессируют CD40L из своего эндогенного локуса, они, вероятно, могут демонстрировать более низкие уровни экспрессии исходного уровня.

**[00556]** ОТ-001663 и ОТ-001664 продемонстрировали лиганд-зависимую стабилизацию при уровне белка, измеренном с помощью вестерн-блоттинга.

**[00557]** Пример 3. Регуляция *in vitro* трансдуцированных растворимым CD40L клеток Jurkat и первичных Т-клеток

**[00558]** Конструкции на основе растворимого CD40L (sCD40L) ОТ-001672, ОТ-001686, ОТ-001673, ОТ-001674, ОТ-001677 и ОТ-001684 временно трансфицировали в клетки НЕК293Т. Клетки обрабатывали одним из следующих лигандов: 1 мкМ Shield-1, 50 мкМ TMP, 1 мкМ базедоксифена (BZD) или контролем-основой.

**[00559]** Уровни растворимого CD40L в пг/мл измеряли с помощью ELISA (Табл. 14). Рекомбинантный растворимый CD40L использовали в качестве стандарта в экспериментах.

**[00560]** Таблица 14: Уровни растворимого CD40L

Название	Растворимый CD40L (пг/мл)		Коэффициент стабилизации
	Основа	+лиганд	
ОТ-001672	-	53475	-
ОТ-001686	9583,76	31686,1	3,3
ОТ-001673	1	48196,8	48196,8
ОТ-001674	215,96	1645,44	7,6
ОТ-001684	3	3	1,0

**[00561]** Как продемонстрировано в Табл. 14, лиганд-зависимую регуляцию уровней растворимого CD40L наблюдали в отношении ОТ-001686, ОТ-001673 и ОТ-001674. В независимом эксперименте с аналогичными условиями ОТ-001677 продемонстрировал коэффициент стабилизации 7,2 с очень низкой экспрессией исходного уровня в отсутствие лиганда. Анализ НЕК-Blue CD40, проведенный с конструкциями sCD40L, демонстрирует, что все конструкции являются функциональными. Конструкции ОТ-001672, ОТ-001686 и ОТ-001673 продемонстрировали более высокую функциональность, чем другие исследованные конструкции. Никакой детектируемой активности не наблюдали в отношении клеток, обработанных соответствующими контролями-основами.

**[00562]** Пример 4. Конструирование CD40L для снижения шеддинга

**[00563]** Шеддазы, например, ADAM10/17, присутствующие в микроокружении опухоли, могут

расщеплять CD40L, тем самым предупреждая успешную активацию CD40 с помощью CD40L. Анализ последовательности CD40L выявляет сайт протеолитического расщепления ADAM10/17. OT-001669, которая имеет делецию аминокислот 1-13 CD40L, разрабатывали для уменьшения интернализации, а OT-001668, которая имеет делецию аминокислот 110-116 CD40L, разрабатывали для удаления сайтов ADAM10/17. Клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие полноразмерную конструкцию OT-001661, OT-001669 или OT-001668, культивировали в течение 6 ч с 1,25 мкг/мл рекомбинантного рецептора CD40-Fc человека (h) или мыши (m) или оставляли без обработки и исследовали с помощью анализа ELISA (Табл. 15).

**[00564]** Таблица 15: Уровни CD40L в супернатанте

Конструкция	Без обработки и	hCD40-Fc	mCD40-Fc
OT-001661	1382,06	3599,72	2589,21
OT-001669	2137,69	8444,30	4335,76
OT-001668	10	10	10

**[00565]** Как видно из Табл. 15, шеддинг наблюдали даже в отсутствие обработки CD40-Fc, что указывает на некоторый конститутивный шеддинг. CD40-Fc человека, по-видимому, усиливал шеддинг в клетках, экспрессирующих OT-001669, однако шеддинг не наблюдали в отношении OT-001668, в которой отсутствует сайт ADAM10/17. CD40-Fc мыши также демонстрировал активность в отношении CD40L человека, что свидетельствует о межвидовой перекрестной реактивности.

**[00566]** Пример 5. Функциональный анализ регулируемого CD40L

**[00567]** Для участия дендритных клеток в иммунном ответе, дендритные клетки должны быть переведены в функциональное состояние с помощью антигенспецифической CD4+ Т-клетки-хелпера. За активацией дендритных клеток может следовать активация CD8+ Т-клеток дендритными клетками, процесс, называемый лицензированием дендритных клеток. Взаимодействие CD40L, экспрессированного на CD4+ клетках, с CD40 на дендритных клетках может приводить к (i) стимуляции дендритных клеток, измеряемой путем экспрессии костимулирующих молекул и молекул МНС, (ii) высвобождению провоспалительных цитокинов (например, IL12, TNF $\alpha$  и INF $\gamma$ ), (iii) распространению эпитопа. Для измерения эффекта экспрессии CD40L, который настраивается биоконтурными по настоящему изобретению, CD4+ Т-клетки или клетки Jurkat, экспрессирующие любую из конструкций CD40L, описанных в данном документе, культивировали с дендритными клетками.

**[00568]** Функцию дендритных клеток в ответ на сокультивирование с Т-клетками, экспрессирующими CD40L, оценивали в присутствии лиганда или соответствующего контроля-

основы. Дендритные клетки, полученные из моноцитов (mDC) (CD14+), выделяли из свежей крови и культивировали в течение 5 дней с IL-4 (7,5 нг/мл) и GM-CSF (20 нг/мл). mDC замораживали после 5-дневного культивирования. Т-клетки трансдуцировали с помощью OT-001662 и экспандировали в течение 9 дней перед замораживанием. mDC и Т-клетки размораживали и сокультивировали в соотношении 1:10 DC: Т-клетки (т.е.  $5 \times 10^4$  DC:  $5 \times 10^5$  Т-клеток). mDC и Т-клетки кокультивировали в течение 2 дней перед тем, как клетки собирали для проточной цитометрии, а супернатанты собирали для анализа цитокинов. Для оценки регулируемых конструкций лиганд (различные дозы TMP) добавляли во время начала сокультивирования и выдерживали в сокультуре в течение 2 дней. Цитокины анализировали с помощью MSD после однократного цикла замораживания-размораживания. Все клетки в ходе эксперимента культивировали в полной RPMI с 10% FBS. Процент клеток в сокультуре mDC-Т, экспрессирующих CD40L, и их MFI, представлен в Табл. 16. SR обозначает коэффициент стабилизации.

**[00569]** Таблица 16: Уровни CD40L в Т-клетках с сокультурой mDC

Конструкция	Лиганд	CD4+				CD8+			
		% CD40L+	SR (на основе %)	MFI CD40L	SR (на основе MFI)	% CD40L+	SR (на основе %)	MFI CD40L	SR (на основе MFI)
Пустой вектор	DMSO	11,5	-	125		1,1		62,5	
	TMP	11,1	-	122		1,02		61,2	
OT-001661	DMSO	68,1	-	579		62,2		495	
	TMP	68,3	-	580		62,3		499	
OT-001662	TMP (10 мкм)	84,1	22,67	1379	21,61	74,9	159,36	951	16,45
	TMP (2 мкм)	78	21,02	691	10,83	57,8	122,98	419	7,25
	TMP (0,5 мкм)	3,34	0,90	61,1	0,96	0,57	1,21	54,5	0,94
	TMP (0,1 мкм)	4,32	1,16	69,8	1,09	0,69	1,47	61,5	1,06
	DMSO	3,71	-	63,8	-	0,47		57,8	

**[00570]** Лиганд-зависимая регуляция CD40L была очевидна как в CD4+ клетках, так и в CD8+ клетках, особенно при более высоких дозах TMP в сокультурах, содержащих OT-001662, о чем свидетельствуют коэффициенты стабилизации. По сравнению с CD8+ клетками, более высокие значения MFI наблюдали в CD4+ клетках, но только при более высоких дозах TMP. Регулируемый

CD40L также индуцировал изменения продуцирования цитокинов в анализе сокультивирования с DC (см. Табл. 17).

**[00571]** Таблица 17: Продуцирование цитокинов (пг/мл)

Конструкция	Лиганд	IFN $\gamma$	IL12	TNF $\alpha$
Пустой вектор	DMSO	6647,38	0,4868	156,7256
	TMP	8043,85	0,6782	153,6723
OT-001661	DMSO	12973	58,935	456,3242
	TMP	10939,9	86,229	440,0804
OT-001662	TMP (10 мкМ)	13539,7	59,254	251,2844
	TMP (2 мкМ)	16375,2	19,372	248,7836
	TMP (0,5 мкМ)	3587,14	-	83,86263
	TMP (0,1 мкМ)	7432,13	0,0705	130,9627
	DMSO	3791,2	0,2535	82,2712

**[00572]** Уровни IFN $\gamma$ , полученные с помощью 10 мкМ TMP в OT-001662, были сопоставимы с уровнями, наблюдаемыми в отношении конститутивной конструкции OT-001661, тогда как более низкие дозы TMP демонстрировали дозозависимое увеличение IFN $\gamma$ . Также наблюдали повышение уровня IL-12 и TNF $\alpha$  в зависимости от дозы TMP.

**[00573]** Пример 6. CD40L, регулируемый PDE5

**[00574]** Конструкцию OT-001892 с линкером GGSGGGSGGGSG исследовали в клетках HEK293T. 1 мкг ДНК, соответствующей OT-001892, трансфицировали в 300000 клеток. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали лигандом (1 мкМ варденафила) или контролем-основой в течение дополнительных 24 ч. Поверхностную экспрессию CD40L анализировали с помощью FACS. 30% клеток HEK293T, трансфицированных OT-001892, обработанных 1 мкМ варденафила, были положительными по CD40L, тогда как только 9% клеток HEK293T, трансфицированных OT-001892, обработанных контролем-основой, были положительными в отношении экспрессии CD40L. Таким образом, наблюдали лиганд-зависимое увеличение процента CD40L положительных клеток.

**[00575]** Экспрессию конструкции OT-001892 также измеряли в контексте трансдуцированных клеток Jurkat и T-клеток. Клетки Jurkat высевали по 10000 на планшет и трансдуцировали 10 мкл лентивируса, соответствующего OT-001892. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали лигандом (1 мкМ варденафила) или контролем-основой в течение дополнительных 24 ч. Поверхностную экспрессию CD40L анализировали с помощью FACS. 37,6% клеток Jurkat, трансдуцированных OT-001892, обработанных 1 мкМ варденафила, были положительными по CD40L, тогда как только 2,7% клеток Jurkat, трансдуцированных OT-001892, обработанных

контролем-основой, были положительными в отношении экспрессии CD40L. Медианную интенсивность флуоресценции, составляющую 233, наблюдали в клетках, обработанных 1 мкМ варденафила, по сравнению с MFI, составляющей -187, в группе, обработанной контролем-основой.

**[00576]** Т-клетки трансдуцировали 10 мкл лентивируса, соответствующего OT-001892. Через 4 дня после трансдукции клетки обрабатывали возрастающими концентрациями лиганда (варденафила) или контролем-основой в течение 24 часов. Поверхностную экспрессию CD40L в Т-клетках, а также субпопуляций CD4+ и CD8+ анализировали с помощью FACS. Результаты представлены в Табл. 18. Коэффициент стабилизации (SR) можно определить как соотношение экспрессии CD40L в ответ на варденафил к экспрессии CD40L в отсутствие варденафила.

**[00577]** Таблица 18: Уровни CD40L в конструкции CD40L, регулируемой PDE5

Варденафил	Все клетки		CD4+ клетки		CD8+ клетки	
	MFI	SR	MFI	SR	MFI	SR
DMSO	209		227		144	
0,0001 мкМ	274	1,31	313	1,38	166	1,15
0,001 мкМ	260	1,24	291	1,28	166	1,15
0,01 мкМ	265	1,27	304	1,34	162	1,13
0,1 мкМ	311	1,49	359	1,58	171	1,19
1 мкМ	405	1,94	482	2,12	186	1,29
10 мкМ	747	3,57	930	4,10	340	2,36
100 мкМ	1168	5,59	1367	6,02	620	4,31

**[00578]** Как продемонстрировано в Табл. 18, более высокие коэффициенты стабилизации получали в CD4+ популяции по сравнению с CD8+ клетками, что указывает на более высокие уровни экспрессии. Дозозависимый ответ лиганда наблюдали во всех измеренных популяциях клеток, и всего лишь 0,0001 мкМ варденафила приводил к коэффициенту стабилизации более 1. Сравнение MFI, полученных с помощью обработанных пустым вектором и DMSO CD4+ клеток, трансдуцированных OT-001892, продемонстрировало, что экспрессия CD40L ниже в клетках, обработанных DMSO, по сравнению с клетками, экспрессирующими пустой вектор. Дестабилизация эндогенного CD40L в обработанных DMSO клетках может приводить к наблюдаемому снижению экспрессии CD40L в обработанных DMSO клетках.

**[00579]** Пример 7. Эффективность коэкспрессии CD40L с CAR CD19 в модели опухоли

**[00580]** Исследование *in vitro*

**[00581]** Для определения того, коэкспрессируют ли трансдуцированные Т-клетки CAR CD19 и CD40L, активированные Т-клетки трансдуцировали с помощью лентивирусов пустыми векторами (EV), конститутивным CD40L (OT-001661), CAR CD19 (OT-001407) и CD40L с CAR CD19 (OT-

001605), выращенными в течение 2 дней, а затем измеряли поверхностные уровни CD40L и CD19, при этом наблюдали повышенную экспрессию для конструкций CAR CD19 и CD40L и CAR CD19 в Т-клетках. Результаты для CD4+ и CD8+ клеток и всех клеток представлены ниже.

**[00582]** Таблица 19: Процент клеток, коэкспрессирующих CD40L и CAR CD19

Конструкция	CD4+	CD8+	Все клетки
Пустой вектор	0%	0%	0%
OT-001661	0%	0%	0%
OT-001407 (0,1 мкл)	19,9%	1,2%	15,7%
OT-001407 (0,05 мкл)	13,8%	0,6%	10,9%
OT-001605	20,9%	10,9%	18,9%

**[00583]** Исследование *in vivo*

**[00584]** Повышенная экспрессия CD40L на CD19 положительных клетках CART может повышать эффективность CAR+ Т-клеток *in vivo*. Для исследования этого, мышам в возрасте 8 недель вводили Nalm6-luc (1 миллион на мышь). В день 6 измеряли опухолевую нагрузку Nalm6 и мышей распределяли на группы для того, чтобы убедиться, что все группы имели одинаковыми размерами опухолей. В день 7 Т-клетки, трансдуцированные конструкциями, вводили мышам, и создавали группы, представленные в Табл. 20. Массу тела и интенсивность биолюминесценции (BLI) измеряли дважды в неделю. Средние значения BLI представлены в Табл. 21. Кровь и плазму крови также собирали для анализа цитокинов, CD40L и IL12.

**[00585]** Таблица 20: Когорты для исследования опухолей

Группа	Количество мышей	CAR+ Т клетка # x 10 <sup>6</sup>	Конструкция
1	8	-	Пустой вектор
2	8	-	Только CD40L (OT-001661)
3	4	3	Только CD19CAR (OT-001407)
4	8	1	Только CD19CAR (OT-001407)
5	8	0,3	Только CD19CAR (OT-001407)
6	5	3	CD19CAR и CD40L (OT-001605)
7		1	CD19CAR и CD40L (OT-001605)

8	8	0,3	CD19CAR и CD40L (OT-001605)
10	8	1	Только контроль CD19CAR (OT-001662)

**[00586]** Таблица 21: Средние значения BLI

Конструкция (ниже)/день (в пределах)	6	13	20	25	28	32	36	39
Пустой вектор	2.04E+06	1.97E+08	2.21E+09	5.35E+09	1.41E+10	-	-	-
OT-001661	2.04E+06	2.69E+08	2.52E+09	5.99E+09	1.04E+10	-	-	-
3M CAR+ OT- 001407 (n=4)	2.02E+06	4.24E+06	7.47E+05	8.06E+05	8.39E+05	8.87E+05	1.35E+06	4.72E+06
1M CAR+ OT- 001407 (n=5 из 8)	2.02E+06	4.88E+07	3.99E+07	1.04E+08	3.15E+08	5.87E+09	3.33E+09	9.80E+09
0.3M CAR+ OT-001407(n= 4 из 8)	2.01E+06	1.09E+08	5.34E+08	1.25E+09	1.34E+09	2.20E+09	7.92E+09	7.26E+09
3M CAR+ OT- 001605 (n=5)	1.98E+06	3.09E+07	1.00E+06	7.54E+05	7.39E+05	8.05E+05	7.23E+05	6.97E+05
1M CAR+ OT- 001605	2.02E+06	2.82E+07	8.19E+05	8.93E+05	1.11E+06	1.07E+06	9.11E+05	7.12E+05
0.3M CAR+ OT-001605	2.03E+06	1.27E+08	2.44E+08	2.27E+07	5.81E+06	2.91E+06	2.52E+06	2.66E+06
1M CAR+ OT- 001607 (IRES)	2.05E+06	6.32E+06	1.26E+06	3.46E+06	6.89E+06	6.14E+07	4.49E+08	3.53E+09
1M CAR+ OT- 001607: Контрольная партия (n=2 из 8)	2.06E+06	2.12E+08	1.23E+09	4.55E+09	8.13E+09	3.62E+09	8.85E+09	3.50E+09

**[00587]** Как продемонстрировано в Табл. 21, значения BLI снижались, когда Т-клетки CD19CAR-2A-CD40L вводили мышам NALM6, что указывает на снижение опухолевой нагрузки. Хотя клетки, содержащие только CD19CAR, продемонстрировали некоторое снижение BLI, оно не было таким

значительным, как в группе CD19CAR-2A-CD40L.

**[00588]** Клетки человека анализировали с помощью FACS (hCD45+) из крови через 14 дней после инфузии Т-клеток, что соответствует 21 дню после имплантации опухоли. Результаты представлены в Табл. 22, где М означает миллион.

**[00589]** Таблица 22: Процент hCD45+ клеток

Конструкция	Индивидуальные значения				Среднее значение
Пустой вектор	0,027	0,57	0,27	0,062	0,232
OT-001661	0,00249	0,00331	0,00198	0	0,002
OT-001407 (3M)	0,1	1,06	0,72	1,65	0,883
OT-001407 (1M)	0,4	0,081	0,12	0,028	0,157
OT-001407 (0,3M)	0,012	0,019	0,00803	0,00702	0,012
OT-001605 (3M)	26,9	12,8	13,2	14,9	16,950
OT-001605 (1M)	37	5,29	27,8	4,23	18,580
OT-001605 (0,3M)	0,032	8,35	2,46	6,23	4,268
OT-001607 (1M)	0,45	0,86	0,67	0,46	0,610
OT-001607 (контроль) (1M)	0,014	0,011	0,5	0,012	0,134

**[00590]** Как представлено в Табл. 22, OT-001605 (1M) продемонстрировала наиболее высокую экспансию Т-клеток со всеми 3 группами количества клеток. Эти результаты демонстрируют, что экспрессия CD40L увеличивает экспансию CAR-зависимых Т-клеток *in vivo*.

**[00591]** Пример 8. Кинетика CD40L в клетках Jurkat

**[00592]** Кинетику исследовали с использованием стабильно трансдуцированных клеток Jurkat, экспрессирующих OT-001662. Для изучения кинетики включения экспрессии CD40L клетки обрабатывали TMP (5 или 50 мкМ) и фиксировали для FACS через 0, 3, 6, 9, 24, 48 часов. В конце эксперимента все фиксированные клетки окрашивали и параллельно анализировали с помощью FACS. Для изучения кинетики выключения экспрессии экспрессию сначала индуцировали в клетках Jurkat с помощью 50 мкМ TMP. Затем клетки промывали для удаления TMP и фиксировали через 0, 3, 6, 9, 24 часа, окрашивали и параллельно анализировали с помощью FACS. В Табл. 23 и Табл. 24 продемонстрирована кинетика включения и выключения экспрессии соответственно.

**[00593]** Таблица 23: Кинетика при включенном состоянии

Часы	TMP (50 мкМ)	5 мкМ TMP	Основа

0	743	743	740
3	890	886	765
6	1180	1096	783
9	1466	1392	772
24	3952	2435	778

**[00594]** Таблица 24: Кинетика при выключенном состоянии

Часы	ТМР (50 мкМ)	Основа
0	3952	778
3	1631	829
6	1620	823
9	1037	823
24	1287	923

**[00595]** Как представлено в Табл. 23 и Табл. 24, поверхностная экспрессия постепенно увеличивается в течение 24 часов, возможно, в связи с необходимостью тримеризации CD40L для транспортировки. Однако отклонение кинетики проявляется быстро, указывая на то, что период полураспада поверхностного CD40L является коротким. В качестве альтернативы это также предполагает, что при удалении лиганда может происходить активная дестабилизация/отщепление от клеточной поверхности.

**[00596]** Пример 9. Регуляция CD40L в Т-клетках

**[00597]** Т-клетки трансдуцировали ОТ-001662, а затем обрабатывали 10 мкМ ТМР в день 4. Экспрессию CD40L анализировали с помощью FACS как в популяциях CD4, так и в CD8 положительных Т-клеток. Результаты представлены в Табл. 25.

**[00598]** Таблица 25: MFI CD40L in vitro

Конструкция	CD4+	CD8+
Пустой вектор	781	190
ОТ-001661	24489	14352
ОТ-001662 (основа)	348	182
ОТ-001662 (ТМР)	10159	4893

**[00599]** Лиганд-зависимую регуляцию наблюдали при обработке ТМР с уровнями CD40L ниже, чем те, которые наблюдали в отношении конститутивной конструкции CD40L, а именно ОТ-001661.

**[00600]** На основании данных in vitro исследовали регулируемость конструкций CD40L in vivo.

Самкам мышей NSG в возрасте 10 недель инъецировали Т-клетки, трансдуцированные одной из следующих конструкций: пустым вектором, OT-001661 и OT-001662 (день 0). В день 1 у мышей предварительно брали кровь перед введением дозы лиганда. В день 2 мышам каждые 4 часа вводили дозу TMP в дозе 500 мг/кг массы тела мыши или контроля-основы. Через два часа после каждой дозы у мышей брали кровь для измерения уровней CD40L. В день 3, т.е. через 24 часа после первой дозы, у мышей окончательно брали кровь для анализа. Уровни CD40L представлены в Табл. 26. Значения, выделенные жирным шрифтом, представляют собой средние значения для каждого отбора крови.

**[00601]** Таблица 26: % CD40L положительных клеток *in vivo*

Конструкция (ниже)/часы (в пределах)	0	2	6	10	24
EV	2,2	5,1			5,2
	3,0	2,3			1,5
	3,9	3,2			0,7
	3,7	0,0			1,6
	3,2	2,6			2,2
OT-001661	80,9	85,6			53,5
	87,1	67,4			66,7
	84,4	33,3			61,0
	107,8	62,7			41,9
	90,1	62,3			55,8
OT-001662, основа	0,8	0,6	0,3	0,0	0,0
	0,9	1,0	0,4	0,0	0,3
	0,1	0,0	0,5	0,0	1,4
	1,8	1,9	0,2	0,3	0,7
	0,9	0,9	0,3	0,1	0,6
OT-001662, TMP	0,9	11,8	22,1	26,0	1,2
	0,4	13,0	25,7	21,4	0,8
	0,9	9,6	13,8	0,0	18,9
	1,8	0,0	18,0	33,1	27,2
	1,0	8,6	19,9	20,1	12,0

**[00602]** Пиковую 20% экспрессию CD40L наблюдали через 10 часов после введения исходной дозы. Также во всех случаях было отмечено, что регулируемая экспрессия CD40L была ниже, чем

у конститутивно экспрессируемой конструкции после воздействия лиганда.

**[00603]** Пример 10. Активация дендритных клеток

**[00604]** Для исследования того, способен ли CD40L функционально активировать дендритные клетки *in vivo*, выполняли последовательные интраперитонеальные (IP) или внутривенные (IV) инъекции аллогенных moDC и CD40L+/- T-клеток мышам NSG. Различные группы, используемые в исследовании, представлены в Табл. 27. Для этих экспериментов использовали конструкцию OT-001661, а результаты представлены в Табл. 28.

**[00605]** Таблица 27: Группы исследования

Гр.	T-клетка # x 106	DC # x 106	Инъекция Материал	Время инъекции
1	-	-	Наивные	-
2	6,9	-	CD40L в отдельности	Тот же день (день 0)
3	6,9	1	CD40L (IV) + DC (IV)	Тот же день (день 0)
4	6,9	5	CD40L (IV) + DC (IV)	Тот же день (день 0)
5	11,9	1	CD40L (IV) + DC (IP)	5x 106 T-клеток (день 0); 5x106 T-клеток (день 1)
6	6,9	1	CD40L (IP) + DC (IP)	Тот же день (день 0)
7	6,9	1	CD40L (IV) + GMCSF/предварительно обработанные IL-4 DC (IV)	Тот же день (день 0)
8	6,9	1	CD40L (IP) + GMCSF/предварительно обработанные IL-4 DC (IP)	Тот же день (день 0)

**[00606]** Таблица 28: Уровни IL-12 в плазме крови (пг/мл)

Дни	16	24	40
Наивные	-	0,04	-

Т-клеточный EV (IP) + DC (IP)	0,73	-	-
	1,97	-	-
	2,67	-	-
	1,13	-	-
Т-клеточный CD40L (IP) + DC (IP)	237,07	152,53	59,04
	45,57	30,23	8,53
	121,73	68,25	27,33
	308,61	336,05	142,68
Т-клеточный CD40L (IP) + DC-стим. (IP)	3,26	3,75	1,31

**[00607]** Результаты в Табл. 28 демонстрируют, что Т-клетки, экспрессирующие CD40L, могут стимулировать moDC *in vivo* для секреции детектируемых уровней IL12, предполагая, что экспрессирующие CD40L Т-клетки способны активировать дендритные клетки, приводя к секреции IL12.

**[00608]** Пример 11. Регуляция CD40L в Т-клетках с помощью различных доменов, чувствительных к лекарственным средствам

**[00609]** Для исследования регуляции активированные Т-клетки трансдуцировали с помощью лентивирусов CD40L, регулируемым различными доменами, чувствительными к лекарственным средствами, активированные Т-клетки трансдуцировали с помощью лентивирусов регулируемым ecDHFR CD40L (OT-001662), регулируемым ER CD40L (OT-001966), регулируемым PDE5 CD40L (OT-001892) и контролем CD40L (OT-001661). Через два дня клетки обрабатывали носителем или 100 мМ лиганда в течение 24 ч, как описано в Табл. 29, после чего их анализировали в отношении поверхностной экспрессии CD40L. Результаты для CD4+ и CD8+ клеток и всех клеток представлены ниже. В таблице «TMP» обозначает триметоприм, «Baz» обозначает базедоксифен, «Vard» обозначает варденафил и «DMSO» обозначает диметилсульфоксид.

**[00610]** Таблица 29: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Конструкция (DD)	Лиганд	CD4+		CD8+		Все клетки	
		CD40L положительные	MFI	CD40L положительные	MFI	CD40L положительные	MFI
OT-001661 (контроль CD40L)	н/д	98,7%	24489	97,8%	14352	98%	20451
OT-001662 (ecDHFR)	DMSO	8,8%	152	91,8%	2,1	7,6%	140

OT-001662 (ecDHFR)	10 мкМ, TMP	94,4%	2608	74,9%	1070	89,7%	2122
OT-001962 (hDHFR)	DMSO	58,3%	548	4,1%	157	46,5%	434
OT-001962 (hDHFR)	100 мкМ TMP	83,5%	1468	32,1%	455	71,6%	1109
OT-001966 (ER)	DMSO	17%	197	2,2%	95,6	14%	174
OT-001966 (ER)	1 мкМ Baz	62,8%	543	42,3%	339	58,1%	490
OT-001892 (PDE5)	DMSO	11%	172	3,1%	121	9,7%	160
OT-001892 (PDE5)	100 мкМ Vard	53,7%	494	75,2%	745	70,6%	682

**[00611]** Регулируемая экспрессия в отношении всех доменов, чувствительных к лекарственным средствам, значительно повышала экспрессию CD40L за пределы эндогенных уровней. Домены, чувствительные к лекарственным средствам ecDHFR, демонстрируют уровни, близкие к конститутивной экспрессии с дозами лиганда, которые близки к клинически значимым уровням.

**[00612]** Пример 12. Мутанты мультимеризации CD40L

**[00613]** Мутации конструировали внутри полезной нагрузки CD40L для снижения аффинности связывания полезной нагрузки CD40L с CD40L, эндогенно экспрессируемым клетками. Конструкции OT-002078, OT-002079, OT-002080, OT-002081, OT-002082 получали с мутантами тримеризации CD40L. Клетки HEK293T временно трансфицировали конструкциями, и экспрессию CD40L измеряли с помощью FACS. Процент клеток HEK293T, положительных в отношении экспрессии CD40L на клеточной поверхности, представлен в Табл. 30.

**[00614]** Таблица 30: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Конструкция	% CD40L положительных
OT-002078	49,7
OT-002079	64,7
OT-002080	0,11
OT-002081	8,84

OT-002082	0,028
OT-001661	43,3
Нетрансфицированные	0,073
Неокрашенные	0,070

**[00615]** Конструкции OT-002078 и OT-002079 продемонстрировали более 50% экспрессии на клеточной поверхности. Поскольку поверхностная экспрессия CD40L зависит от тримеризации, эти данные предполагают, что мутантные по тримеризации белки все еще способны взаимодействовать друг с другом, что приводит к их поверхностной экспрессии.

**[00616]** Пример 13. Регулируемая ER экспрессия CD40L

**[00617]** Т-клетки трансдуцировали с помощью OT-001662 или OT-001666. В день 4 клетки обрабатывали возрастающими дозами TMP в отношении Т-клеток, экспрессирующих OT-001662. Клетки, экспрессирующие OT-001666, обрабатывали либо возрастающими концентрациями базедоксифена, либо ралоксифена. Данные представлены в Табл. 30 как процент CD40L положительных Т-клеток. Как представлено в Табл. 31 и Табл. 32, как TMP, так и базедоксифен индуцировали дозозависимое увеличение % CD40L положительных Т-клеток. Зависимую от ралоксифена экспрессию OT-001666 наблюдали только при дозе 1 мкМ.

**[00618]** Таблица 31: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Доза TMP (мкМ)	OT-001662
100	73,3
10	71
1	38,8
0,1	13,3
0,01	8,74

**[00619]** Таблица 32: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Доза (мкМ)	Базедоксифен	Ралоксифен
1	13,5	7,1
0,1	7,67	5,18
0,01	5,42	5
0,001	5,17	5,01
0,0001	4,88	4,67

**[00620]** Для исследования влияния длины линкера на опосредованную DD регуляцию CD40L, получали конструкции с различной длиной линкера. Получали конструкции OT-001966, OT-001965,

OT-001967, OT-001666, которые представлены в данном документе в порядке убывания длины линкера. Клетки HEK293T временно трансфицировали этими конструкциями и обрабатывали 1 мкМ базедоксифена в течение 24 часов. Медианную интенсивность флуоресценции, индикатор поверхностной экспрессии CD40L, анализировали с помощью проточной цитометрии. Все исследованные конструкции продемонстрировали зависимость от базедоксифена регуляцию экспрессии CD40L, что указывает на то, что все исследованные линкеры обеспечивают регуляцию. Самая длинная конструкция на основе линкера OT-001966 приводила к самому высокому проценту клеток с высокой поверхностной экспрессией CD40L.

**[00621]** Клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусом и через 24 часа после трансдукции обрабатывали DMSO или 1 мкМ базедоксифена в течение еще 24 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии в отношении поверхностной экспрессии CD40L. В Табл. 33 представлен процент CD40L положительных клеток. В Табл. 33 SR обозначает коэффициент стабилизации.

**[00622]** Таблица 33: Процент клеток Jurkat, экспрессирующих CD40L

Конструкция	DMSO	1 мкМ базедоксифена	SR
OT-001966	3	46	15,3
OT-001965	3	27	9
OT-001967	2	30	15
OT-001666	10	30	3

**[00623]** Как продемонстрировано в Табл. 33, самая длинная конструкция на основе линкера OT-001966 приводила к самому высокому проценту клеток с высокой поверхностной экспрессией CD40L. Эта тенденцию наблюдали и при расчетах коэффициента стабилизации.

**[00624]** Т-клетки трансдуцировали с помощью OT-001966, OT-001967, OT-001666. В день 4 клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Аналогично экспериментам, осуществляемым на клетках HEK293T и Jurkat, более длинный линкер усиливал поверхностную экспрессию в отношении регулируемых ER конструкций CD40L.

**[00625]** Дозу-ответ базедоксифена в Т-клетках определяли для OT-001966, OT-001967, OT-001666. Экспрессию CD40L измеряли в (а) день 4 после трансдукции, (b) после замораживания и размораживания клеток или (с) после замораживания и размораживания клеток с последующей рестимуляцией гранулами CD3/CD28. MFI CD40L (медианная интенсивность флуоресценции) в CD4 и CD8 положительных субпопуляциях показана в Табл. 34 и Табл. 35 соответственно.

**[00626]** Таблица 34: Экспрессия CD40L в CD4+ клетках

Доза (нМ)	OT-001666			OT-001967			OT-001966		
	После	Рестимуля	Ден	После	Рестимуля	Ден	После	Рестимуля	Ден

	разморажива ния	ция	ь 4	разморажива ния	ция	ь 5	разморажива ния	ция	ь 4
0,01	134	592	372	156	913	473	183	340	415
0,1	138	658	420	160	922	474	185	340	499
1	145	682	427	161	913	483	193	364	545
10	162	658	476	172	1131	497	213	472	616
100	208	953	732	200	1549	630	258	561	102
1000	241	1688	1397	223	1232	998	292	741	8
10000	537	1577	1274	457	291	100 0	577	447	155 1
									109 5

**[00627]** Таблица 35: Экспрессия CD40L в CD8+ клетках

Доза (нМ)	OT-001666			OT-001967			OT-001966		
	После разморажива ния	Рестимуля ция	Ден ь 4	После разморажива ния	Рестимуля ция	Ден ь 5	После разморажива ния	Рестимуля ция	Ден ь 4
0,01	103	238	165	108		153	113	340	168
0,1	105	244	171	105	269	153	117	340	176
1	107	263	172	108	274	157	121	364	190
10	117	253	176	114	265	158	148	472	212
100	170	354	313	149	326	226	204	561	442
1000	213	567	601	178	445	424	230	741	669
10000	326	458	404	263	372	392	375	447	438

**[00628]** Как продемонстрировано в Табл. 34 и Табл. 35, базедоксифен влияет на состояние клеток при максимальной дозе. Рестимуляция Т-клеток была необходима для более высокой экспрессии после замораживания-размораживания. Среди CD8 положительных клеток наиболее высокую регулируемую ER экспрессию CD40L наблюдали с использованием длинного линкера OT-001966 и рестимуляции.

**[00629]** Пример 14. Регулируемая DHFR экспрессия CD40L человека и E. coli

**[00630]** Клетки НЕК 293Т временно трансдуцировали регулируемыми hDHFR конструкциями, а именно OT-001962, OT-001961, OT-001963, в течение 24 часов. После трансфекции клетки обрабатывали 50 мкМ TMP в течение 24 часов, и экспрессию CD40L на клеточной поверхности

измеряли с помощью проточной цитометрии. В Табл. 36 представлен % CD40L положительных клеток при обработке TMP. Экспрессию CD40L в отсутствие лиганда практически не определяли.

**[00631]** Таблица 36: % экспрессии CD40L при обработке TMP

Конструкция	% CD40L
OT-001962	14,3
OT-001961	14,6
OT-001963	13,3

**[00632]** Данные в Табл. 36 демонстрируют, что CD40L может регулироваться DD hDHFR и TMP.

**[00633]** Клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусами, соответствующими OT-001662, OT-001962, OT-001961, OT-001963. Через 24 часа после трансдукции клетки разделяли и обрабатывали DMSO или 50 мкМ TMP в течение еще 24 часов до анализа на основе проточной цитометрии. Результаты представлены в Табл. 37, где SR обозначает коэффициент стабилизации.

**[00634]** Таблица 37: % экспрессии CD40L при обработке TMP

Конструкция	Основа	TMP	SR
OT-001662	1	90	90
OT-001962	3	50	16,7
OT-001961	2	3,5	1,8
OT-001963	2	20	10

**[00635]** Среди исследованных конструкций hDHFR OT-001962 продемонстрировала значительную TMP-зависимую регуляцию и наиболее высокий коэффициент стабилизации.

**[00636]** Исследование дозы-ответа TMP в T-клетках проводили для OT-001962. Экспрессию CD40L измеряли в (a) день 4 после трансдукции, (b) после замораживания и размораживания клеток или (c) после замораживания и размораживания клеток с последующей рестимуляцией гранулами CD3/CD28. MFI CD40L (медианная интенсивность флуоресценции) в CD4 и CD8 положительных субпопуляциях показана в Табл. 38.

**[00637]** Таблица 38: Экспрессия CD40L с OT-001962

Доза (нМ)	CD4+			CD8+		
	После размораживания	Рестимуляция	День 4	После размораживания	Рестимуляция	День 4
0,1	153	631	388	111	254	181

1	156	647	396	116	257	178
10	158	645	405	114	258	182
100	165	644	388	117	255	182
1000	166	737	480	118	258	204
10000	186	1382	1067	129	382	393
100000	395	6275	5917	236	1185	1941

**[00638]** Как продемонстрировано в Табл. 38, рестимуляция после замораживания и размораживания требовалась для достижения экспрессии CD40L, которая была сопоставима с экспрессией, полученной через 4 дня после трансдукции.

**[00639]** Клетки НЕК293Т временно трансфицировали конструкциями, приведенными в Табл. 39 (1 мкг ДНК). Через 24 часа после трансфекции среду удаляли и заменяли свежей средой, содержащей 50 мкМ TMP или DMSO. Еще через 24 часа клетки анализировали с помощью проточной цитометрии в отношении поверхностной экспрессии CD40L. В Табл. 39 представлена экспрессия CD40L как в % CD40L положительных клеток, так и в значениях медианной интенсивности флуоресценции (MFI).

**[00640]** Таблица 39: Экспрессия CD40L с помощью конструкций CD40L-ecDHFR

Конструкция	Лиганд	% CD40L	MFI (медиана)	SR (для % CD40L)	SR (для MFI)
OT-002021	TMP	70,7	18589	2,98	3,31
	Основа	23,7	5616		
OT-002022	TMP	70,5	19941	2,96	2,89
	Основа	23,8	6896		
OT-002023	TMP	62,4	16902	3,55	2,84
	Основа	17,6	5956		
OT-002024	TMP	53,9	12938	3,05	1,93
	Основа	17,7	6718		
OT-002025	TMP	61,7	16230	1,41	2,24
	Основа	43,7	7241		
OT-002026	TMP	63,4	17721	3,66	2,45
	Основа	17,3	7241		
OT-002027	TMP	70,7	19679	2,84	2,58
	Основа	24,9	7619		
OT-002028	TMP	69,1	16196	2,81	2,42

	Основа	24,6	6705		
OT-002029	TMP	45	7720	2,07	1,03
	Основа	21,7	7519		
OT-002030	TMP	64,9	14855	1,95	1,92
	Основа	33,3	7734		
OT-002031	TMP	64,8	15856	2,44	2,16
	Основа	26,6	7351		
OT-002032	TMP	68,7	21363	3,37	2,88
	Основа	20,4	7407		
OT-002033	TMP	17,3	5521	1,63	0,93
	Основа	10,6	5933		
OT-002034	TMP	71,1	20569	2,44	2,59
	Основа	29,1	7957		
OT-002035	TMP	23,8	8311	0,89	0,97
	Основа	26,7	8535		
OT-002036	TMP	69,5	17914	2,37	2,66
	Основа	29,3	6730		
OT-002037	TMP	63,5	13928	2,08	2,00
	Основа	30,6	6961		
OT-002038	TMP	67,9	20029	1,86	2,89
	Основа	36,6	6922		
OT-002039	TMP	64,2	16404	1,83	2,10
	Основа	35,1	7793		
OT-002040	TMP	65,8	16938	1,65	2,18
	Основа	40	7778		

**[00641]** За исключением OT-002035, все исследованные конструкции продемонстрировали экспрессию CD40L, опосредованную TMP.

**[00642]** Пример 15. Регулирование устойчивого к расщеплению CD40L

**[00643]** Т-клетки трансдуцировали с помощью OT-001668 и в день 4 рассчитывали процент субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих CD40L (в составе как CD4, так и CD8). Результаты представлены в Табл. 40.

**[00644]** Таблица 40: Экспрессия CD40L

Конструкция	CD4+	CD8+
-------------	------	------

Пустой вектор	20,6	0,51
OT-001668	95,5	86,7

**[00645]** Высокую экспрессию CD40L наблюдали в отношении конструкции, устойчивой к расщеплению, OT-001668. Некоторую экспрессию наблюдали в отношении Т-клеток, трансдуцированных пустым вектором, что, вероятно, представляет собой экспрессию эндогенного CD40L, экспрессируемого CD4+ Т-клетками. Т-клетки трансдуцировали регулируемой есDHFR конструкцией OT-001671, которая содержит белок CD40L, устойчивый к расщеплению. В день 4 клетки обрабатывали 10 мкМ TMP в течение 24 часов. TMP-опосредованную регуляцию экспрессии CD40L наблюдали как в популяциях CD4, так и в CD8 Т-клеток. В независимом эксперименте Т-клетки, трансдуцированные различными объемами вируса, соответствующего OT-001671, обрабатывали возрастающими дозами TMP в течение 24 часов. Процент CD40L положительных клеток показан в Табл. 41. В Табл. 41 0,5 мкл, 2 мкл и 10 мкл указывают на разные объемы использованного вируса.

**[00646]** Таблица 41: Доза-ответ TMP

Доза TMP (мкМ)	CD4+			CD8+		
	0,5 мкл	2 мкл	10 мкл	0,5 мкл	2 мкл	10 мкл
0,001	17,9	11,8	4,74	0,59	0,6	1,18
0,01	18,8	12,2	6,79	0,56	0,59	0,89
0,1	20,4	14,9	7,65	0,45	0,88	0,95
1	20,3	17,6	17,2	0,43	1,29	2,87
10	27,5	30	43,7	2,44	5,57	12,4

**[00647]** Регулируемый есDHFR устойчивый к расщеплению CD40L продемонстрировал увеличение процента CD40L положительных клеток в ответ на увеличение дозы TMP. Более высокие уровни добавленного вируса (0,5, 2 или 10 мкл) увеличивали уровни CD40L при более высоких дозах TMP. Аналогичные экспериментальные тенденции наблюдали при измерениях значений медианной интенсивности флуоресценции.

**[00648]** Пример 16. Регуляция CD40L *in vivo* в клетках Jurkat

**[00649]** Клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие OT-001661, OT-002034, вводили внутривенно мышам NSG в возрасте 8 недель (20 миллионов клеток на мышь). Начиная с дня 15 мышам перорально вводили дозу в соответствии с дизайном исследования, показанным в Табл. 42, и клетки Jurkat собирали из костного мозга в день 16 и анализировали с помощью FACS. В Табл. 41 и 42 TMP относится к триметоприму и все дозировки относятся к временной точке «0 ч» в день 16. Результаты представлены в Табл. 43 и Табл. 44, где «EV» относится к контролю пустым вектором.

**[00650]** Таблица 42: Дизайн исследования

Гр.	Мыши (n)	Клетки Jurkat (x10 <sup>6</sup> )	Вектор (название)	Лиганд (дозирование относительно временной точки «0 ч» в день 16)
1	4	20	Парентеральные клетки Jurkat	Основа (1х доза в -20 ч, 1х доза в 0 ч)
2	4	20	OT-001661	Основа (1х доза в -20 ч, 1х доза в 0 ч)
3	4	20	OT-002034 (ecDHFR)	Основа (3х доза в день 16 в 0, 4, 8 ч)
4	4	20	OT-002034 (ecDHFR)	TMP 500 мг/кг (3х доза в день 16 в 0, 4, 8 ч)

**[00651]** Таблица 43: Значения MFI CD40L

Описание	EV	OT-001661	OT-002034 Основа	OT-002034 TMP
Мышь 1	145	507	101	608
Мышь 2	153	572	80,6	542
Мышь 3	121	660	97,9	505
Мышь 4	158	607	95,1	428
Среднее значение	144,25	586,5	93,65	520,75

**[00652]** Таблица 44: Процент CD40L положительных клеток

Описание	EV	OT-001661	OT-002034 Основа	OT-002034 TMP
Мышь 1	9,27	52,5	2,36	61
Мышь 2	9,11	57,5	0,83	56,3
Мышь 3	5,46	64,2	2,17	52,2
Мышь 4	10,4	61,4	1,92	44,1
Среднее значение	8,56	58,9	1,82	53,4

**[00653]** Как продемонстрировано в Табл. 43 и Табл. 44, OT-002034, экспрессирующие клетки Jurkat, извлеченные из костного мозга мышей, обработанных TMP, продемонстрировали повышенные значения CD40L и % CD40L-положительных клеток по сравнению с мышами, обработанными контрольной основой или пустым вектором, но сопоставимые с клетками Jurkat,

экспрессирующими ОТ-001661.

**[00654]** Хотя настоящее изобретение было описано довольно подробно и с некоторой конкретностью в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими подробностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но должно интерпретироваться со ссылками на прилагаемую формулу изобретения, чтобы обеспечить максимально широкую интерпретацию такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем настоящего изобретения.

**[00655]** Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, является превалирующим. Кроме того, материалы, заголовки разделов, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или мутант CD40L, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W или G227F, по отношению к SEQ ID NO: 3820.
2. Композиция по п. 1, в которой указанный SRE содержит полностью или частично DRD, выбранный из белка ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR, причем DRD дополнительно содержит одну или несколько мутаций в указанной аминокислотной последовательности белка ER, есDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR.
3. Композиция по п. 2, в которой указанный DRD получен из белка ER и в которой указанный DRD имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 633, 637, 641, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724 или 726.
4. Композиция по п. 2, в которой указанный DRD получен из белка есDHFR и в которой указанный DRD имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 253, 255, 264, 267, 269, 6554, 6556, 6558, 6560, 6562, 6564, 6566, 6568, 6570, 6572, 6574, 6576, 6578, 6580, 6582, 6584, 6586, 6588 или 6590.
5. Композиция по п. 2, в которой указанный DRD получен из белка FKBP и в которой указанный DRD имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 270, 271, 272, 274, 277, 285 или 286.
6. Композиция по п. 2, в которой указанный DRD получен из белка PDE5 и в которой указанный DRD имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 294, 296, 298, 300, 302, 306, 308, 313, 315, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 389, 391, 394, 397, 400, 403, 406, 409, 412, 415, 417, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 563, 565, 567, 569, 571, 573, 575, 577, 579, 581, 583, 585, 587, 589, 591, 593, 595, 597, 599, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 6406, 6408, 6410, 6412, 6414, 6416, 6418, 6420, 6422, 6424, 6426, 6428, 6430, 6432, 6434, 6436, 6438, 6440, 6442, 6444, 6446, 6448, 6450, 6452, 6454, 6456, 6458, 6460, 6462, 6464, 6466, 6468, 6470, 6472, 6474, 6476, 6478, 6480, 6482, 6484, 6486, 6488, 6490, 6492, 6494, 6496, 6498, 6500, 6502, 6504, 6506, 6508, 6510, 6512, 6514, 6516, 6518, 6520, 6522, 6524, 6526, 6528 или 6530.

7. Композиция по п. 2, в которой указанный DRD получен из белка hDHFR и в которой указанный DRD имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 179, 181, 183, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 201, 203, 205, 207, 209, 210, 212, 214, 216, 218, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251 или 6552.
8. Композиция по любому из пп. 1-7, в которой указанный DRD реагирует или взаимодействует по меньшей мере с одним стимулом.
9. Композиция по п. 8, в которой указанный стимул представляет собой малую молекулу.
10. Композиция по п. 1, в которой указанный SRE содержит вторую полезную нагрузку, причем вторая полезная нагрузка представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).
11. Композиция по п. 10, в которой указанная вторая полезная нагрузка содержит CAR CD19.
12. Композиция по п. 11, в которой указанный SRE содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6539.
13. Эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент, чувствительный к лекарственным средствам (DRD), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанный DRD содержит полностью или частично белок ER, ecDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR, при этом DRD дополнительно содержит одну или несколько мутаций в указанной аминокислотной последовательности белка ER, ecDHFR, FKBP, PDE5 или hDHFR, и при этом указанная первая полезная нагрузка содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или его мутант CD40L человека.
14. Эффекторный модуль по п. 13, причем указанный эффекторный модуль содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 6546 или SEQ ID NO: 6550 или SEQ ID NO: 6620 или SEQ ID NO: 6622 или SEQ ID NO: 6624 или SEQ ID NO: 6626 или SEQ ID NO: 6628 или SEQ ID NO: 6630 или SEQ ID NO: 6632 или SEQ ID NO: 6634 или SEQ ID NO: 6636 или SEQ ID NO: 6638 или SEQ ID NO: 6640 или SEQ ID NO: 6642 или SEQ ID NO: 6644 или SEQ ID NO: 6646 или SEQ ID NO: 6648 или SEQ ID NO: 6650 или SEQ ID NO: 6652 или SEQ ID NO: 6654 или SEQ ID NO: 6656 или SEQ ID NO: 6658 или SEQ ID NO: 6660 или SEQ ID NO: 6662 или SEQ ID NO: 6664 или SEQ ID NO: 6666 или SEQ ID NO: 6668 или SEQ ID NO: 6670 или SEQ ID NO: 6672.
15. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанная первая полезная нагрузка представляет собой мутантный CD40L.

16. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанный DRD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253, 255, 264, 267, 269, 6554, 6556, 6558, 6560, 6562, 6564, 6566, 6568, 6570, 6572, 6574, 6576, 6578, 6580, 6582, 6584, 6586, 6588 или 6590.

17. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанный DRD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 633, 637, 641, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724 или 726.

18. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанный DRD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270, 271, 272, 274, 277, 285 или 286.

19. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанный DRD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294, 296, 298, 300, 302, 306, 308, 313, 315, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 375, 378, 381, 384, 387, 389, 391, 394, 397, 400, 403, 406, 409, 412, 415, 417, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 563, 565, 567, 569, 571, 573, 575, 577, 579, 581, 583, 585, 587, 589, 591, 593, 595, 597, 599, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 6406, 6408, 6410, 6412, 6414, 6416, 6418, 6420, 6422, 6424, 6426, 6428, 6430, 6432, 6434, 6436, 6438, 6440, 6442, 6444, 6446, 6448, 6450, 6452, 6454, 6456, 6458, 6460, 6462, 6464, 6466, 6468, 6470, 6472, 6474, 6476, 6478, 6480, 6482, 6484, 6486, 6488, 6490, 6492, 6494, 6496, 6498, 6500, 6502, 6504, 6506, 6508, 6510, 6512, 6514, 6516, 6518, 6520, 6522, 6524, 6526, 6528 или 6530.

20. Эффекторный модуль по п. 13, в котором указанный DRD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 179, 181, 183, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 201, 203, 205, 207, 209, 210, 212, 214, 216, 218, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251 или 6552.

21. Эффекторный модуль по любому из пп. 13-20, в котором указанный DRD реагирует или взаимодействует по меньшей мере с одним стимулом.

22. Эффекторный модуль по п. 20 или п. 21, в котором указанный стимул представляет собой малую молекулу, и указанная молекула представляет собой TMP или MTX.

23. Эффекторный модуль по п. 19, в котором указанный стимул представляет собой малую молекулу, и указанная

малая молекула представляет собой варденафил, тадалафил или силденафил.

24. Эффекторный модуль по п. 17 или п. 18, в котором указанный стимул представляет собой малую молекулу, причем указанная малая молекула представляет собой базедоксифен, ралоксифен или Shield-1.

25. Выделенный полипептид, содержащий эффекторный модуль по любому из пп. 13-25.

26. Полинуклеотид, кодирующий композицию по любому из пп. 1-12, или эффекторный модуль по любому из пп. 13-24, или выделенный полипептид по п. 25.

27. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 26.

28. Модифицированная клетка, содержащая: композицию по любому из пп. 1-12, или эффекторный модуль по любому из пп. 13-24, или выделенный полипептид по п. 25, или полинуклеотид по п. 26, или вектор по п. 27.

29. Модифицированная клетка по п. 28, причем указанная модифицированная клетка представляет собой иммунную клетку.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-12, или эффекторный модуль по любому из пп. 13-24, или выделенный вариант полипептида по п. 25, или полинуклеотид по п. 26, или вектор по п. 27, или модифицированную клетку по любому из пп. 28-29, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

31. Способ получения клетки, содержащей эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит CD40L человека (SEQ ID NO: 3820) или мутантный CD40L, включающий введение по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты в одну или несколько клеток, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CD40L человека (SEQ ID NO: 3820), или его мутант CD40L, функционально связанный со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD).

32. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

a. получение одной или нескольких клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CD40L человека (SEQ ID NO: 3820), или его мутант CD40L, функционально связанный со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей домен, чувствительный к лекарственному средству (DRD);

b. доставку одной или нескольких клеток субъекту; и

с. введение субъекту лиганда, который стабилизирует DRD в достаточной степени для того, чтобы обеспечить экспрессию CD40L человека или его мутанта CD40L в одной или нескольких клетках;

причем экспрессия CD40L человека или его мутанта CD40L регулируется присутствием лиганда у субъекта, и количество и/или продолжительность введения лиганда достаточны для продуцирования терапевтически эффективного количества CD40L человека или его мутанта CD40L, по меньшей мере, в одной клетке в популяции клеток.

33. Способ по п. 32, в котором по меньшей мере одна нуклеиновая кислота кодирует белковую конструкцию, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 6546 или SEQ ID NO: 6550 или SEQ ID NO: 6620 или SEQ ID NO: 6622 или SEQ ID NO: 6624 или SEQ ID NO: 6626 или SEQ ID NO: 6628 или SEQ ID NO: 6630 или SEQ ID NO: 6632 или SEQ ID NO: 6634 или SEQ ID NO: 6636 или SEQ ID NO: 6638 или SEQ ID NO: 6640 или SEQ ID NO: 6642 или SEQ ID NO: 6644 или SEQ ID NO: 6646 или SEQ ID NO: 6648 или SEQ ID NO: 6650 или SEQ ID NO: 6652 или SEQ ID NO: 6654 или SEQ ID NO: 6656 или SEQ ID NO: 6658 или SEQ ID NO: 6660 или SEQ ID NO: 6662 или SEQ ID NO: 6664 или SEQ ID NO: 6666 или SEQ ID NO: 6668 или SEQ ID NO: 6670 или SEQ ID NO: 6672.

34. Способ по п. 32, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR CD19.

35. Способ по любому из пп. 32-34, в котором указанный DRD реагирует или взаимодействует по меньшей мере с одним стимулом.

36. Способ по п. 35, в котором указанный стимул представляет собой малую молекулу.

37. Способ по п. 32, в котором по меньшей мере одна клетка представляет собой иммунную клетку, выбранную из группы, состоящей из: Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), NKT-клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), лимфоцита, инфильтрирующего опухоль (TIL), Т-клетки памяти, регуляторной Т-клетки (Treg), клетки-киллера, индуцированной цитокинами (CIK), лимфоцита, инфильтрирующего опухоль (TIL), дендритной клетки.

38. Способ по любому из пп. 32-37, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

39. Способ уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта, включающий:

(а) введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунных клеток по п. 38, содержащих композицию, содержащую элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO. 3820); или фармацевтической композиции; и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула для модуляции экспрессии первой полезной нагрузки, за счет чего уменьшается опухолевая нагрузка.

40. Способ активации дендритных клеток у субъекта, включающий стадии:
- (a) введения субъекту одной или нескольких иммунных клеток, при этом одна или несколько иммунных клеток содержат эффекторный модуль, при этом эффекторный модуль имеет по меньшей мере один элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с первой полезной нагрузкой, при этом указанная первая полезная нагрузка содержит полностью или частично CD40L человека (SEQ ID NO. 3820) или его мутант; при этом иммунная клетка представляет собой Т-клетку;
  - (b) введения субъекту терапевтически эффективного количества стимула, при этом стимул представляет собой лиганд, для модуляции экспрессии первой полезной нагрузки; и
  - (c) измерения маркера активации дендритных клеток IL12 у субъекта в ответ на лиганд для измерения активации дендритных клеток.
41. Способ по п. 40, в котором указанная дендритная клетка представляет собой миелоидную дендритную клетку, плазматическую дендритную клетку, CD14<sup>+</sup> дендритную клетку, клетку Лангерганса или микроглию.
42. Способ по п. 41, в котором указанная дендритная клетка представляет собой миелоидную дендритную клетку.
43. Способ по п. 40, в котором указанный эффекторный модуль дополнительно содержит вторую полезную нагрузку, содержащую: химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор химерного переключателя, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, слитый полипептид цитокин-цитокиновый рецептор или любые их комбинации.
44. Способ по п. 43, в котором указанная вторая полезная нагрузка представляет собой CAR CD19.